

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Tesis previa a la obtención del título de: INGENIEROS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:
**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LAS
SALES DE ÁCIDOS BILIARES: COLATO Y DEHIDROCOLATO DE
SODIO, POR MICROORGANISMOS AISLADOS EN DOS CAMALES DE
LA SIERRA ECUATORIANA.**

AUTORES:
ANDRÉS FERNANDO DAZA VÉLEZ
JUAN CARLOS PINEDA CHAVEZ

TUTORA:
MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

Quito, abril del 2014

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO
DEL TRABAJO DE GRADO**

Autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, abril del 2014

Andrés Fernando Daza Vélez

CC: 1719568642

Juan Carlos Pineda Chavez

CC: 1720259991

DEDICATORIA

Con todo mi cariño a mi madre y mis familiares que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi agradecimiento.

Juan Carlos Pineda Chavez

Esta tesis la dedico a todos y cada uno de los miembros de mi familia que me motivaron a transitar por estos caminos y que con desprendimiento y cariño me han apoyado y motivado a realizar el presente estudio.

Andrés Fernando Daza Vélez

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana por contribuir con nuestra formación humana y profesional.

A nuestra Directora de Tesis la Dra. María Elena Maldonado Rodríguez, por darnos las directrices necesarias para poder culminar este trabajo de investigación.

A la Dra. Stefania Costa, por su amistad y ayudarnos a resolver los diversos problemas experimentales presentados en el área de análisis químico.

A nuestros profesores que nos forjaron valores y nos brindaron sus conocimientos para ser unos grandes profesionales.

A la Ing. Tatiana Mosquera Directora del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad por abrirnos las puertas para realizar nuestra investigación.

A el Ing. Edison Osorio y la Ing. Karina Hidalgo ayudantes de Cátedra, por su colaboración eficiencia y paciencia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	2
MARCO TEÓRICO.....	2
1.1. Esteroides	2
1.1.1. Estructura esteroide.....	2
1.1.2. Colesterol	3
1.2. Ácidos biliares.....	4
1.2.1. Los ácidos biliares.....	4
1.2.2. Los ácidos biliares como principales componentes de la bilis.....	7
1.2.3. Funciones fisiológicas de los ácidos biliares	8
1.2.4. La biosíntesis de los ácidos biliares	9
1.2.5. Estructura y actividad de los ácidos biliares	10
1.2.6. Patologías asociadas a los ácidos biliares	10
1.2.7. Tratamiento para los cálculos	11
1.2.8. Aplicaciones en la industria farmacéutica.....	12
1.3. La biotransformación	16
1.3.1. Los biocatalizadores.....	16
1.3.2. Aspectos técnicos de las biotransformaciones	18
1.3.3. Biocatalizadores	19
1.3.4. Reacciones químicas que intervienen en las transformaciones microbianas ...	20
1.4. Técnicas metodológicas	23
1.4.1. Análisis de cromatografía en capa fina (TLC).....	23
1.4.2. Resonancia magnética nuclear	24
1.4.3. Identificación del género de los microorganismos.....	24
1.5. Descripción de los medios de cultivo.....	25
1.6. Objetivos	26
1.6.1. General:.....	26
1.6.2. Específicos:	26
1.7. Hipótesis.....	26
1.7.1. Hipótesis alternativa.....	26
1.6.2. Hipótesis nula.....	26
CAPÍTULO II.....	27

MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPOS	27
2.1. Fase de muestreo y análisis	27
2.1.1. Delimitación de lugares de estudio	27
2.1.2. Materiales y método para el muestreo en los lugares de faenamiento	28
2.1.3. Procedimiento de recolección de muestras y aislamiento de bacterias	29
2.2. Screening de la capacidad de biotransformación de los microorganismos mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC)	30
2.4. Escalamiento de cultivo de bacterias y hongos	32
2.5. Identificación de bacterias	33
2.5.1. Tinción de Gram	33
2.5.2. Pruebas bioquímicas	34
CAPÍTULO III	35
RESULTADOS	35
3.1. Situación de los camales en el Ecuador	35
3.1.1. Antecedentes	35
3.1.2. Camal Municipal de Riobamba	36
3.1.3. Camal Municipal de Ambato	38
3.1.4. Camal Municipal de Pedernales	40
3.1.5. Camal Municipal de Guayaquil	41
3.1.6. Camal Municipal de Esmeraldas (San Mateo)	43
3.1.7. Camal de Antonio Ante	45
3.1.8. Camal Municipal de Latacunga	46
3.1.9. Camal Municipal de Cayambe	46
3.1.10. Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito, EMRAQ EP	47
3.1.11. Panorama general de los camales del Ecuador	50
3.2. Resultado del aislamiento de bacterias y hongos de los camales municipales de Latacunga y Cayambe	52
3.3. Resultados de la biotransformación de la sal de ácido biliar colato de sodio por bacterias	56
3.4. Capacidad de biotransformación e incapacidad de biotransformación de colato de sodio por bacterias.	58
3.5. Determinación de la capacidad de biotransformación del colato de sodio por bacterias.	59
3.6. Resultados de la biotransformación de colato de sodio por hongos	61

3.7. Escalamiento de bacterias de interés que biotransforman la sal de ácido biliar colato de sodio	62
3.8. Resultado de identificación de las bacterias.....	63
3.9. Resultados de la biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por bacterias	64
3.10. Determinación de la capacidad de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio	66
3.11. Resultados de la biotransformación de la sal de ácido biliar colato de sodio por hongos.....	68
3.12. Escalamiento de bacterias de interés que biotransforman la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio	70
3.13. Identificación de bacterias.....	71
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	75
LISTA DE REFERENCIAS	76
ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de núcleo esteroide	2
Figura 2. Estructura plana del colesterol.....	3
Figura 3. Estructuras del ácido cólico y quenodesoxicólico	4
Figura 4. Estructura de ácido desoxicólico	5
Figura 5. Estructura de ácido litocólico	5
Figura 6. Estructura del ácido dehidrocólico	6
Figura 7. Estructura del ácido cólico	7
Figura 8. Hidrólisis alcalina para liberar ácidos biliares.....	13
Figura 9. Síntesis química de ácido ursodesoxicólico a partir de ácido quenodesoxicólico.	14
Figura 10. Obtención de ácido ursodesoxicólico a partir de ácido quenodesoxicólico	15
Figura 11. Mecanismos propuestos para la reacción de epimerización en C-3 de ácido quenodesoxicólico.	21
Figura 12. Reacciones de oxidación y reducción.....	22
Figura 13. Reducción de ácido dehidrocólico a 12-cetoquenodesoxicólico	22
Figura 14. Reacciones de hidroxilación y deshidroxilación.	23
Figura 15. Capacidad e incapacidad de biotransformación de colato de sodio por bacterias	58
Figura 16. Porcentaje de biotransformación de sal de ácido biliar (dehidrocolato de sodio) por bacterias.....	66
Figura 17. Porcentaje de biotransformación de sal de ácido biliar (dehidrocolato de sodio) por hongos.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la bilis humana	8
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la utilización de células enteras	17
Tabla 3. Ventajas y desventajas de la utilización de enzimas aisladas	18
Tabla 4. Cantidad de bilis de las reses.	37
Tabla 5. Bacterias aisladas en el camal de Latacunga	52
Tabla 6. Hongos aislados en el camal de Latacunga.....	53
Tabla 7. Bacterias aisladas del camal de Cayambe. Sección 1	54
Tabla 8. Hongos aislados en el camal de Cayambe	56
Tabla 9. Resultado de biotransformación de colato de sodio por bacterias	57
Tabla 10. Rango de porcentajes de biotransformación	59
Tabla 11. Porcentaje de biotransformación de colato de sodio entre el 50-100% realizado por bacterias	60
Tabla 12. Rango de porcentaje de biotransformación de la sal de ácido biliar colato de sodio por bacterias	61
Tabla 13. Resultados de la biotransformación de colato de sodio por hongos.	62
Tabla 14. Identificación de las bacterias de mayor interés con capacidad para biotransformar la sal de ácido biliar colato de sodio	63
Tabla 15. Resultado de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por bacterias	65
Tabla 16. Porcentajes de biotransformación del dehidrocolato de sodio por bacterias	67
Tabla 17. Rango de porcentaje de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por bacterias	67
Tabla 18. Biotransformación de dehidrocolato de sodio por hongos.....	68
Tabla 19. Porcentajes de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por hongos	70
Tabla 20. Identificación de las bacterias de mayor interés con capacidad para biotransformar la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio	71

Anexo 1. Diagrama del camal municipal de Latacunga.	84
Anexo 2. Diagrama del camal municipal de Cayambe.	85
Anexo 3. TLC bacteria MM EB30, lectura a las 24 horas, ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.....	86
Anexo 4. TLC Bacteria MM EB25, lectura a las 24 horas, ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.....	86
Anexo 5. TLC bacteria MM EB 42, lectura a las 24 horas ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.....	86
Anexo 6. TLC bacteria MM EB37, esta comenzó a las 24 horas la biotransformación con el ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.	87
Anexo 7. TLC bacteria MM EB37 biotransformación a las 48 horas con el ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.....	87
Anexo 8. TLC bacteria MM EB23, MM EB24, MM EB25, MM EB26, MM EB27 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.	87
Anexo 9. TLC bacteria MM EB28, MM EB29, MM EB30, MM EB31, MM EB32 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.	88
Anexo 10. TLC bacteria MM EB33, MM EB34, MM EB35, MM EB36, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.	88
Anexo 11. TLC bacteria MM EB37, MM EB38, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.....	88
Anexo 12. TLC bacteria MM EB41,MM EB42, MM EB43, MM EB44 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.	89
Anexo 13. TLC bacteria MM EB45,MM EB46, MM EB47, MM EB48 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.	89
Anexo 14. TLC bacteria MM EB50,MM EB51, MM EB52, MM EB53 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.	89
Anexo 15. TLC bacteria MM EB54,MM EB55, MM EB56, MM EB57 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.	90
Anexo 16. TLC bacteria MM EB54,MM EB55, MM EB56, MM EB57 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.....	90

Anexo 17. TLC bacteria MM EB23 ,MM EB24, MM EB26, MM EB27, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 1. ...	90
Anexo 18. TLC bacteria MM EB29 ,MM EB30, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 1.....	91
Anexo 19. TLC bacteria MM EB29 ,MM EB30, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 1.....	91
Anexo 20. TLC bacteria MM B37 ,MM B38,MM B39,MM B40 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.	91
Anexo 21. TLC bacteria MM B44 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.	92
Anexo 22. TLC bacteria MM B45 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2	92
Anexo 23. TLC bacteria MM B52 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2	92
Anexo 24. TLC bacteria MM B54, MM B56, MM B57, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.....	93
Anexo 25. TLC bacteria MM B59, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil	93
Anexo 26. TLC bacteria MM B62, MM B64, MM B65, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.....	93
Anexo 27. TLC bacteria MM B66, MM B69, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.	94
Anexo 28. TLC bacteria MM B26, MM B35 Lectura a las 24 y 96 horas, dehidrocolato de sodio, cultivo preparativo. Fase móvil 1	94
Anexo 29. TLC bacteria MM B37 Lectura a las 24 y 48 horas, dehidrocolato de sodio, cultivo preparativo. Fase móvil 1	94
Anexo 30. TLC bacteria MM B27, MM B54, lectura a las 24 y 48 horas, dehidrocolato de sodio, cultivo preparativo. Fase móvil 2.....	95
Anexo 31. TLC hongo MM F11, MM F12,MM F14,MM F15,MM, F16,MM F17, biotransformación a las 24 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.	95
Anexo 32. TLC hongo MM F18, MM F9, MM F6, MM F24, biotransformación con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.	96
Anexo 33. TLC hongo MMF26, MMF27, biotransformación con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.....	96

Anexo 34. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B30 (colato de sodio).....	97
Anexo 35. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B25 (colato de sodio).	98
Anexo 36. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B42 (colato de sodio).	99
Anexo 37. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B37 (colato de sodio).	100
Anexo 38. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B45 (dehidrocolato de sodio).....	101
Anexo 39. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B54 (dehidrocolato de sodio).....	102
Anexo 40. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B35 (dehidrocolato de sodio).....	103
Anexo 41. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B27 (dehidrocolato de sodio).....	104
Anexo 42. Resonancia magnética nuclear	105
Anexo 43. Resonancia magnética nuclear	106
Anexo 44. Resonancia magnética nuclear	107
Anexo 45. Resonancia magnética nuclear	107
Anexo 46. Fotografías tomadas en investigación de los camales del Ecuador	109

RESUMEN

Esta investigación busca encontrar microorganismos capaces de biotransformar las sales de ácidos biliares: colato y dehidrocolato de sodio, que son generadas durante la síntesis química del ácido ursodesoxicólico.

Frente a esto, se buscó evaluar la capacidad de utilizar estos productos de desecho, para volver a sintetizar el ácido ursodesoxicólico o generar moléculas de interés que puedan ser aprovechadas en la síntesis de hormonas. Para ello se utilizó el potencial de biotransformación de los ácidos biliares, realizado por hongos y bacterias que al ser capaces de efectuar modificaciones específicas en la estructura esteroide, brindan múltiples ventajas que se traducen en economía, tiempo, dinero y trabajo.

La evaluación de los microorganismos con capacidad para biotransformar las sales de ácidos biliares (colato y dehidrocolato de sodio) se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina; esta técnica permitió identificar las biotransformaciones realizadas por los microorganismos. Posteriormente se realizó la técnica de resonancia magnética nuclear para poder identificar algunos de los productos de biotransformación.

Para finalizar la investigación se realizó la identificación del género de las bacterias de interés mediante pruebas API (Índice de Perfil Analítico).

Palabras claves: ácido, biliar, biotransformación, microorganismo, esteroide

ABSTRACT

This research intends to find microorganisms capable of biotransform the bile acids salts: cholate and sodium dehydrocholate, which are residues generated during the chemical synthesis out of the ursodeoxycholic acid.

Against this, this investigation was able to evaluate the capacity of using these waste products, for go back synthesize the ursodeoxycholic acid, or generate molecules of interest that can be seized in the hormones synthesis. For this, was used the potential of biotransformation for bile acids realized by fungus and bacterias that are capable to perform specific modifications in the steroid structure, provide multiple benefits that are translated into economy; time and work.

The evaluation of these microorganisms with the capacity of biotransform the bile acids salts (sodium cholate and dehydrocholate) was carried out through thin layer chromatography. Such technique allows identify the biotransformations performed by microorganisms. Later we executed the technique of nuclear magnetic resonance, to identify some products of biotransformation.

To conclude this research, was did the identification of the interest bacterias through API tests (Analytical Profile Index).

Keywords: acid, bile, biotransformation, microorganism, steroid

INTRODUCCIÓN

Uno de los ácidos biliares de mayor estudio y uso es el ácido ursodesoxicólico, extraído de la bilis de oso, que ha sido utilizado desde hace más de 3000 años en la medicina tradicional china, para el tratamiento de enfermedades hepáticas (Bensky, Gamble, & Kaptchuck, 2011). En 1975 se comprobó la efectividad de este ácido como tratamiento para la disolución de cálculos biliares arenosos, con lo cual se hizo necesario producirlo en mayores cantidades y a partir de otros ácidos biliares mediante síntesis química (Kumar & Tandon, 2001).

La síntesis química del ácido ursodesoxicólico fue desarrollada durante los años 50 por Hofman y Fieser, quienes inventaron una metodología con un proceso que consta de 5 pasos (esterificación, acetilación, oxidación, hidrólisis y reducción) para la obtención del ácido quenodesoxicólico y a partir de este, con un proceso que consta de 4 pasos (esterificación, acetilación, oxidación y reducción), obtuvieron el ácido ursodesoxicólico (Fieser & Rajagopalan, 1950). De tal forma que para la obtención de los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico se requiere de un proceso largo, complicado y peligroso debido a la naturaleza y toxicidad de los reactivos que se utilizan.

Durante este proceso se eliminan grandes cantidades de tóxicos, entre ellos el cromo, hidróxido de sodio, disolventes orgánicos, entre otros, además también se realizan procesos de purificación que son necesarios para eliminar los subproductos que se forman en cada etapa de reacción. Todos estos procedimientos químicos provocan un alto grado de contaminación ambiental, incrementan los costos de las empresas y reducen el rendimiento de la producción (Maldonado, 2013).

Por esta razón, en la actualidad la investigación está orientada hacia métodos de síntesis más ecológicos, menos peligrosos para los operarios de las empresas y más económicos. La biotransformación es una alternativa que promete buenos resultados ya que implica el uso de microorganismos no patógenos que permiten modificar compuestos orgánicos de una forma muy específica. Por tal motivo es de mucho interés seguir investigando nuevos microorganismos capaces de catalizar reacciones en las moléculas esteroides, para generar nuevas moléculas con mejores propiedades farmacológicas, mayor especificidad y que generen menores costos a las industrias.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

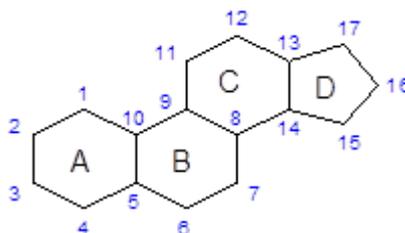
1.1. Esteroides

1.1.1. Estructura esteroide

Lasser (2002) en su trabajo de esteroides tópicos los define como: lípidos simples no saponificables, en su mayoría de origen eucarionte, que derivan del ciclopentano perhidrofenantreno. Su estructura la forman cuatro anillos de carbono convencionalmente denominados A, B, C y D (IUPAC, 1989). Los esteroides se diferencian entre sí por el número y localización de los sustituyentes.

En los esteroides esta estructura básica se modifica por adición de diversos grupos funcionales, como carbonilos e hidroxilos (hidrófilos) o cadenas hidrocarbonadas (hidrófobas). El núcleo esteroide es bastante rígido con una estructura prácticamente plana, que da una molécula anfipática que se define como una estructura molecular que contiene dos propiedades, una hidrofílica (afinidad por el agua) y otra hidrofóbica (rechazo del agua), lo que le confiere la capacidad para estar parcialmente diluida en agua o en disolventes orgánicos (Lasser, 2002).

Figura 1. Estructura básica de núcleo esteroide



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

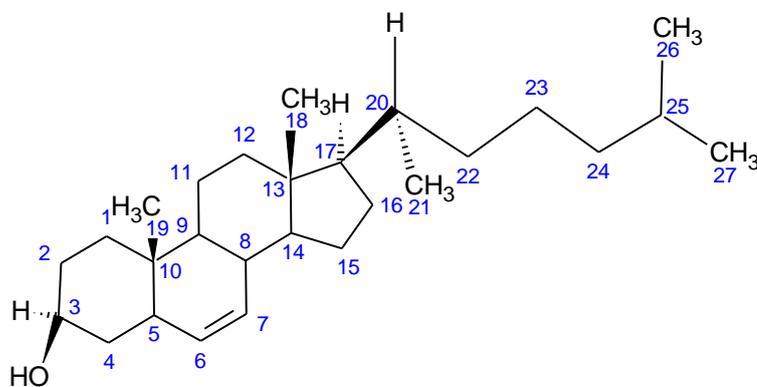
1.1.2. Colesterol

El colesterol es un esteroide que se encuentra comúnmente en la naturaleza teniendo gran relevancia en la biología, medicina y química; como elemento estructural de las membranas celulares de los animales, y es el precursor de las hormonas esteroideas. Se deriva de la molécula ciclopentanoperhidrofenantreno, una clase de lípido terpenoide con un esqueleto de carbono prácticamente plano y relativamente rígido, formado por cuatro anillos alicíclicos condensados. Es un compuesto de carácter hidrófobo y por consiguiente poco soluble en medios acuosos como el plasma. Se puede encontrar libre o esterificado con ácidos grasos, y ambas formas circulan en la sangre unidas a diversas proteínas, constituyendo las lipoproteínas plasmáticas (García, Uhía, & Galan, 2012).

La alta solubilidad del colesterol en la sangre, se debe a la presencia de las lipoproteínas plasmáticas (principalmente LDL que son lipoproteínas de baja densidad y VLDL que son otro tipo de lipoproteínas de muy baja densidad) que tienen la capacidad de fijar y por lo tanto solubilizar grandes cantidades de colesterol (Flórez & Amado, 1997).

En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos. Al igual que los otros lípidos, es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo (CCl₄) (Vázquez, 2003).

Figura 2. Estructura plana del colesterol.



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

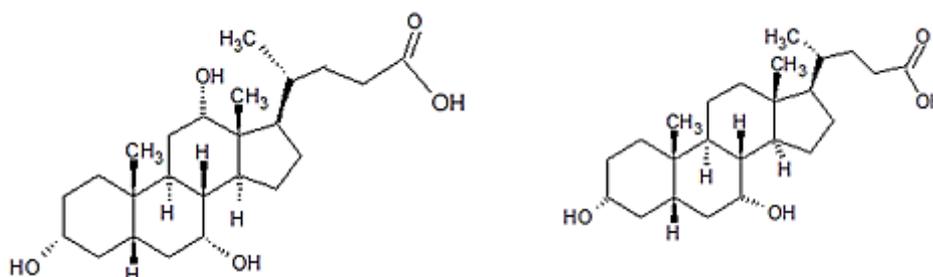
1.2. Ácidos biliares

1.2.1. Los ácidos biliares

Los ácidos biliares son los productos finales más importantes en el metabolismo del colesterol. Derivan de un núcleo de 24 átomos de carbono denominado ácido colánico (Haslewood, 1967), ocupando por lo general las posiciones 3 y 7 hidroxiladas. Estos ácidos se encuentran en la bilis, en los siguientes porcentajes: 37% de conjugados de colato, 33% de conjugados de quenodesoxicolato, 28% de conjugados de desoxicolato, de 1 a 2% de conjugados de litocolato y el ácido ursodesoxicólico se encuentra en trazas que representan menos del 1% (Ahmad, Garg, & Johri, 1992).

Los principales ácidos biliares en la bilis humana son el ácido cólico ($3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihidroxicolánico) y quenodesoxicólico ($3\alpha, 7\alpha$ -dihidroxicolánico) (Hardison & Proffit, 1977).

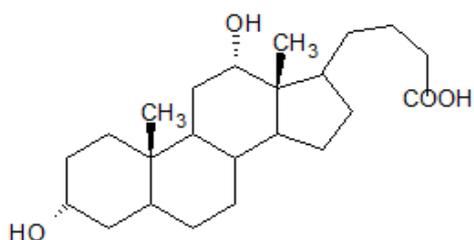
Figura 3. Estructuras del ácido cólico y quenodesoxicólico



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

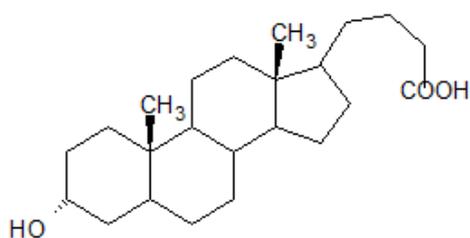
Las bacterias intestinales realizan biotransformaciones, que producen cambios en las estructuras de los ácidos biliares, así el grupo hidroxilo en C-7 es atacado por bacterias anaeróbicas en el colon que eliminan el grupo hidroxilo para formar ácidos biliares 7-desoxi (el término "desoxi" significa que el grupo hidroxilo se ha perdido). En este proceso, el ácido cólico se convierte en ácido desoxicólico. Del mismo modo, mediante la 7-deshidroxilación de ácido quenodesoxicólico, se forma un ácido biliar monohidroxílico que se denomina "ácido litocólico". Los ácidos desoxicólico y litocólico son llamados "ácidos biliares secundarios", ya que se forman a partir de ácidos biliares primarios (Hofmann, 1989).

Figura 4. Estructura de ácido desoxicólico



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Figura 5. Estructura de ácido litocólico



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Los ácidos biliares gracias a su peculiar estructura tridimensional y sus características fisicoquímicas, han sido puntos de partida para la aparición de nuevas aplicaciones, diferentes de las tradicionales, en los campos de la biotecnología, química industrial entre otros. La presencia de uno, dos o tres grupos hidroxilo genera pequeños cambios en las dimensiones moleculares de las diferentes sales biliares, constituyendo así una familia de las moléculas de forma y tamaño prácticamente idénticas (Nair & Kritchevsky, 1971).

Los ácidos biliares que se utilizaron en la presente investigación fueron el ácido dehidrocólico y el ácido cólico. A continuación se realiza una breve descripción de cada uno de ellos.

1.2.1.1. Ácido dehidrocólico

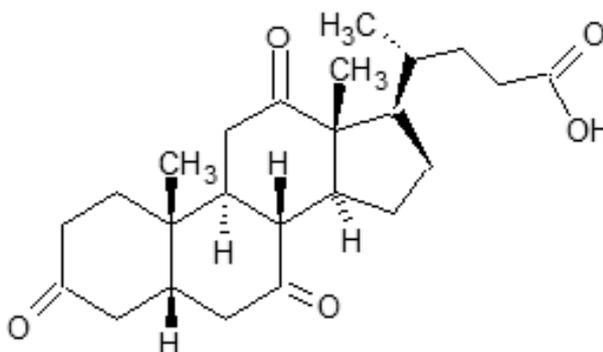
El ácido dehidrocólico (Acido 3, 7,12-tricetocolanoico) es un ácido biliar, formado por la oxidación del ácido cólico (Sergio, Roberto, Piero, & Giacomo, 1986).

1.2.1.1.1. Aplicación terapéutica

Tiene una excelente acción colerética que permite un aumento equilibrado del volumen acuoso de la bilis, sin alterar el contenido de ácidos biliares, haciéndola más fluida y menos densa, lo que permite un fácil drenaje biliar y adecuada emulsificación de los lípidos y vitaminas liposolubles durante la digestión (Yousef, Barnwell, Touchwebwe, Weber, & Roy, 1987).

El ácido dehidrocólico, ha mostrado ser hasta ahora el más potente colerético en cuanto al volumen de bilis secretada, aunque esta aumenta en líquido y no en proporción en sólidos (Yousef, Barnwell, Touchwebwe, Weber, & Roy, 1987).

Figura 6. Estructura del ácido dehidrocólico



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

1.2.1.2. Ácido cólico

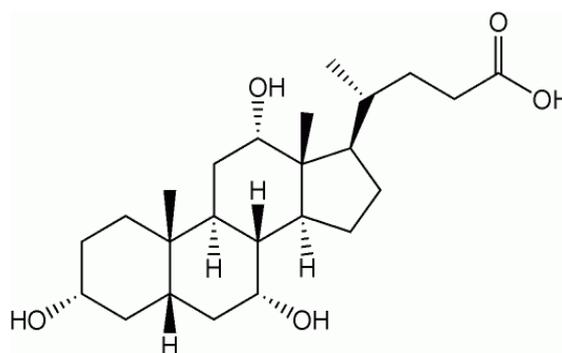
El ácido cólico es un ácido biliar con consistencia blanca cristalina insoluble en agua, con un punto de fusión de 200-201 °C. El ácido cólico es uno de los cuatro ácidos que produce el hígado sintetizado a partir de colesterol. Es soluble en alcohol y en ácido acético. Forma un conjugado con el aminoácido taurina, dando lugar a ácido taurocólico (Lippincott & Wilkins, 2007).

1.2.1.2.1. Aplicación terapéutica

El tratamiento con ácido cólico por vía oral estimula la secreción de bilis y favorece el flujo normal de los ácidos biliares en el proceso digestivo. Además favorece la formación de micelas de lípidos y vitaminas liposolubles en el intestino (Chiang, 2009).

Cuando se administra ácido cólico por vía oral, este ácido biliar primario se absorbe y a través de un proceso de retroalimentación reduce la síntesis hepática de ácidos biliares anómalos y de los metabolitos intermediarios hepatotóxicos (Chiang, 2009).

Figura 7. Estructura del ácido cólico



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

1.2.2. Los ácidos biliares como principales componentes de la bilis

Entre los componentes de la bilis podemos encontrar: agua, sales biliares, bilirrubina, colesterol, ácidos biliares, lecitina, Na⁺, K⁺, Ca⁺, Cl⁻, HCO₃⁻. Las sustancias más abundantes secretadas por la bilis son las sales biliares (que representan alrededor de la mitad del total de sus solutos), pero también intervienen en cantidades considerables la bilirrubina, colesterol, lecitina y electrolitos (Dietschy & Moore, 1964).

Tabla 1. Composición de la bilis humana

Compuestos orgánicos		Compuestos inorgánicos	
Orgánico	Concentración	Iones	Concentración
Ácidos biliares	36 mmol	Na+	150 mmol
Lecitina	9 mmol	K+	4 mmol
Colesterol	2,5 mmol	Ca ⁺⁺	2 mmol
Bilirrubina	1,5 mmol	Mg ⁺⁺	13 mmol
Proteínas	30 mg/100 ml	Cl-	100 mmol
-	-	HCO ₃ ⁻	40 mmol

Fuente: Dietschy & Moore, 1964

1.2.3. Funciones fisiológicas de los ácidos biliares

1) Eliminación de colesterol.- Los ácidos biliares eliminan el colesterol del cuerpo mediante la conversión a ácido biliar y por solubilización micelar de colesterol en la bilis, lo que permite que el colesterol se mueva desde el hepatocito a la luz intestinal, en última instancia conduce a la eliminación a través de la ruta fecal (Maldonado, 2013).

2) Transporte de lípidos en forma de micelas mixtas.- En el intestino delgado, los ácidos biliares promueven la absorción de lípidos de la dieta mediante la solubilización de estos y sus productos de digestión como micelas mixtas (Maitra, Mukhopadhyay, Sarkar, Rao, & Indi, 2001).

3) Homeostasis del colesterol.- el colesterol es eliminado del organismo mediante la conversión del mismo en ácidos biliares. Durante la circulación enterohepática las sales biliares realizan un viaje cíclico desde el hígado hasta el tracto gastrointestinal. Durante esta circulación sólo un 5% de las sales biliares se pierde en el intestino. Si en algún momento, el nivel de las sales biliares presentes aumenta (por ejemplo, por la ingesta de comida) se produce una supresión de la síntesis de las sales biliares y esto afecta a la ruta de eliminación del colesterol (Mukhopadhyay, Maitra, Ira, Krishnamoorthy, Schmidt, & Talmo, 2004).

Los ácidos biliares también solubilizan metales como el hierro y el calcio en el duodeno, promoviendo su absorción. Además intervienen en la absorción de agua y electrolitos por la mucosa colónica, y afectan a la motilidad del colon (Vlahcevic, Heuman, & Hylemon, 1991).

1.2.4. La biosíntesis de los ácidos biliares

Los ácidos biliares son los productos finales de la utilización del colesterol. De esta manera, la síntesis de los ácidos biliares constituye la principal vía de catabolismo de colesterol, esta síntesis se realiza en el hígado (Hardison & Proffit, 1977).

Ahora bien, los ácidos biliares primarios: el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico, por medio de la acción bacteriana, sufren 7- α -deshidroxilación y sus sales biliares resultantes son absorbidas por el hígado. Para ser secretadas en la bilis, las sales biliares necesitan conjugarse, propósito para el que sirven dos aminoácidos, la glicina y la taurina (Hardison & Proffit, 1977).

Por su parte los ácidos biliares secundarios se forman mediante la interacción bacteriana que consiste en la α -deshidroxilación que transforma el ácido cólico en ácido desoxicólico y el ácido quenodesoxicólico en ácido litocólico (Cowen, Korman, Hofman, Cass, & Coffin, 1975).

En contraste con el ácido desoxicólico; la sal biliar monohidroxílica (el ácido litocólico) es muy insoluble, no forma micelas a temperatura corporal y se absorbe mal en el intestino. Por tal motivo tendrá lugar cierta desconjugación bacteriana y cierta desulfatación del litocolato dando como resultado sulfatos hidrosolubles y fácilmente excretables, con esto el cuerpo se protege de una posible lesión (Cowen, Korman, Hofman, Cass, & Coffin, 1975).

Otros cambios bacterianos son la 7 α -deshidrogenación, que da lugar a 7 cetoácidos biliares y probablemente la formación de ácido ursodesoxicólico, que es el epímero 7- β del ácido quenodesoxicólico (Hofman, 1976).

La cantidad total normal de sales biliares, incluidas tanto las primarias como las secundarias, es de 2-4 g y existe equilibrio entre su síntesis a partir del colesterol, su resorción en el íleon terminal y el colon y su pérdida con las heces. En circunstancias normales, una molécula de sal biliar circula entre el hígado y el intestino a través de

la circulación portal unas ocho veces al día. La resorción activa de las sales biliares se produce en el íleon terminal, mientras que la pasiva puede ocurrir en todo el intestino delgado y en el colon. En consecuencia, el organismo es capaz de conservar con gran eficacia las sales biliares, y sólo se pierden 200-600 mg por día por las heces, cifra que representa aproximadamente el 15-20% de la cantidad total de aquéllas y que se repone a diario mediante la “síntesis de novo” de sales biliares primarias (Hofman, 1976).

1.2.5. Estructura y actividad de los ácidos biliares

1.2.5.1. Estructura y función del núcleo esteroide

Una de las principales funciones de los ácidos biliares es la formación de micelas. Las sales biliares contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, y por esta razón actúan como detergentes. La capacidad solubilizadora de las sales biliares es potenciada de modo considerable por los fosfolípidos. La asociación de sales biliares, fosfolípidos y colesterol en una sola molécula hidrosoluble se conoce como solubilización micelar (Howell, Lucy, Pirola, & Bouchier, 1970).

Este fenómeno de las sales biliares ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los últimos 30 años y se puede evaluar a través de su valor de concentración micelar crítica (CMC), que se refiere tanto a una propiedad intrínseca de los ácidos biliares en sí y la cantidad de ácido necesario para funcionar en la formación espontánea y dinámica de las micelas biliares (Yuzhuo, 2008).

Es posible medir el valor de la CMC mediante los valores de tensión superficial, solubilización de colorantes y en las medidas de la actividad por medio de electrodos selectivos de los ácidos biliares (Maldonado, 2013).

1.2.6. Patologías asociadas a los ácidos biliares

1.2.6.1. Litiasis vesicular

La litiasis vesicular es una de las afecciones digestivas más frecuentes, varía ampliamente en todo el mundo, en los Estados Unidos aproximadamente el 10% de la población tiene una colelitiasis documentada, siendo principalmente de colesterol;

en América latina la incidencia es igualmente alta 11%, incluyendo dentro de esta estadística a nuestro país (Gutiérrez, 2005).

La litiasis biliar se clasifica según su composición en:

Cálculos de colesterol constituido en su mayoría por este pigmento son de superficies rugosas, blancas, grandes (Trotman, Ostrow, & Soloway, 1974).

Cálculos de tipo pigmentario, que tienen bajo contenido en colesterol y alto en bilirrubinato de calcio, razón por la cual en su mayoría son radiopacos, pequeños, de colores negros, múltiples y pulidos (Trotman, Ostrow, & Soloway, 1974).

Cálculos mixtos de colesterol y pigmentarios son los más comunes en los Estados Unidos y en los países occidentales; tienen características de los de tipo pigmentario (Trotman, Ostrow, & Soloway, 1974).

1.2.6.2. Datos epidemiológicos

Los datos de los diferentes estudios epidemiológicos muestran moderada diferencia en cuanto a la prevalencia de colelitiasis en diferentes poblaciones; estas diferencias pueden ser a nivel genético, medioambiental, o ambas.

En el Ecuador se diagnostica alrededor de 35 mil pacientes por año con esta patología; en general la colelitiasis es aproximadamente dos veces más frecuente en mujeres, y aproximadamente un 10% de la población tiene colelitiasis. Muchos estudios indican que la prevalencia de colelitiasis en mujeres con edades comprendidas entre 20 y 55 años varía de un 5% hasta un 20%, y en aquellas mayores de 50 años se estima en torno a 25-30% (Gutiérrez, 2005).

1.2.7. Tratamiento para los cálculos

El tratamiento de los cálculos biliares depende del conocimiento de la evolución natural de la enfermedad (Friedman, Raviola, & Fireman, 1989). En vista de que la mayoría de las personas presentan cálculos asintomáticos y pueden permanecer así de forma indefinida, el principal tratamiento de los cálculos es expectante. Se pueden usar tratamientos quirúrgicos y no quirúrgicos (Ransohoff, Gracie, & Wolfenson, 1983).

1.2.7.1. Tratamiento quirúrgico

Colecistectomía laparoscópica.- este método ha sido utilizado en el tratamiento para cálculos sintomáticos; consiste en la extirpación de la vesícula con los cálculos, esto elimina la enfermedad y previene las recurrencias (Lezoche, 2000).

Colecistectomía abierta.- cuando existen sospechas de cáncer en la vesícula o el hallazgo de adherencias densas alrededor de la vesícula pueden llevar al cirujano a efectuar este tipo de intervención quirúrgica (Lezoche, 2000).

1.2.7.2. Tratamiento no quirúrgico

Ácido ursodesoxicólico (UDCA).- Los ácidos biliares por vía oral pueden producir la disolución de los cálculos de colesterol. El UDCA reduce la secreción biliar de colesterol mediante su efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de colesterol. El colesterol queda dispersado de forma eficaz en la bilis en forma de vesículas, lo que evita y corrige su cristalización (Habib, 2001).

Litotripsia extracorpórea.- Es una opción no quirúrgica complementaria con ondas de choque, el objetivo de este método es producir fragmentos muy pequeños que sean susceptibles de ser disueltos con ácidos biliares orales, este método es ideal para personas que poseen pocos cálculos (Habib, 2001).

1.2.8. Aplicaciones en la industria farmacéutica

Antes del auge de la modificación de las sales biliares, que tuvo lugar fundamentalmente a principios de los noventa, ya estaba ampliamente implantado el uso de los ácidos biliares naturales en el tratamiento de enfermedades intestinales (Kumar & Tandon, 2001).

A modo de ejemplo, el ácido ursodesoxicólico inició su camino como agente clínico a principios de los ochenta (Kowdley, 2000), por tener importantes aplicaciones farmacéuticas relacionadas con la capacidad para solubilizar los cálculos biliares, disminuyendo la necesidad de la intervención quirúrgica (Carey & Small, 1972).

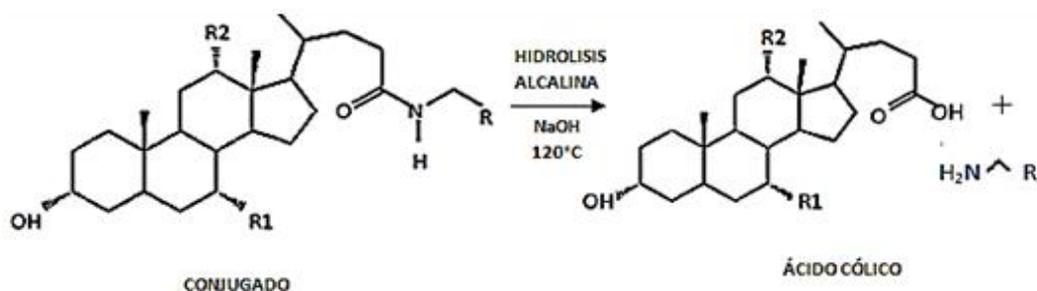
Es así que el ácido ursodesoxicólico sustituyó al ácido quenodesoxicólico en la disolución de cálculos de colesterol dada su eficacia y menores efectos secundarios

como: el aumento de transaminasas y fiebre alta (Pedrini, Medici, & Bianchini, 1999).

Este ácido biliar era extraído de la bilis de osos pertenecientes a la familia Ursidae, de ahí deriva su nombre “ácido ursodesoxicólico”, donde está en mayores cantidades que en otros mamíferos, con el transcurso de los años aumentó la demanda de bilis de este animal para extraer ácido ursodesoxicólico (Bensky, Gamble, & Kaptchuck, 2011), razón por la cual se buscaron procesos de síntesis, que permiten obtener el ácido ursodesoxicólico a partir de otros ácidos biliares como: el ácido cólico y dehidrocólico.

El principal sustrato de partida para la síntesis de ácido ursodesoxicólico, es el ácido cólico, pero este no se encuentra libre y para ello se tiene que realizar un procedimiento complejo que empieza con la hidrólisis para liberar los ácidos biliares que están conjugados con los aminoácidos: taurina y glicina. Esta reacción requiere el uso de grandes cantidades de NaOH y altas temperaturas (120 °C) durante períodos muy largos (8-12 horas) (figura 8) (Maldonado, 2013).

Figura 8. Hidrólisis alcalina para liberar ácidos biliares.



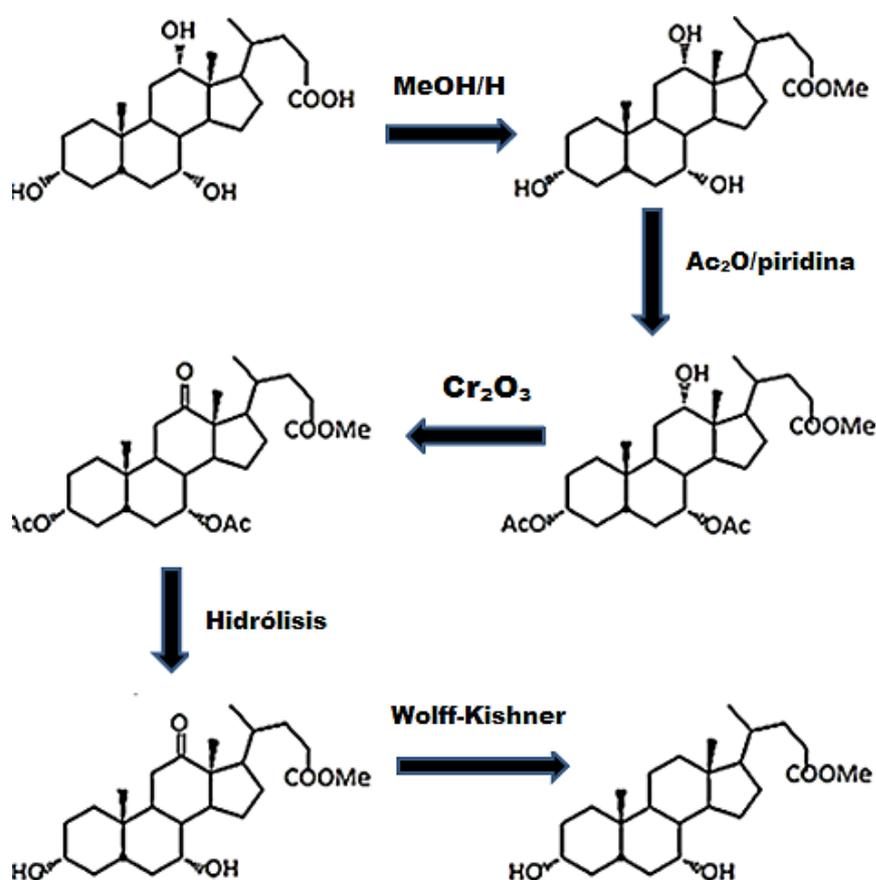
Fuente: Maldonado, 2013

Para la síntesis química de ácido ursodesoxicólico a partir de ácido quenodesoxicólico se ha desarrollado una metodología que consta de cinco pasos (Fieser & Rajagopalan, 1950) (figura 9).

- 1) La esterificación con metanol y la posterior formación de metilcolato;
- 2) La acetilación regioselectiva con piridina y anhídrido acético de los grupos hidroxilo en la posición C-3 y C-7 (protección de grupos funcionales);

- 3) Oxidación en C-12 con CrO_3 ;
- 4) La hidrólisis de metilo y acetilo;
- 5) Reducción de Wolff-Kishner para obtener el ácido quenodesoxicólico.

Figura 9. Síntesis química de ácido ursodesoxicólico a partir de ácido quenodesoxicólico.



Fuente: Maldonado, 2013

Comenzando por el ácido quenodesoxicólico es posible obtener el ácido ursodesoxicólico por medio de la inversión selectiva del oxidrilo en la posición C-7.

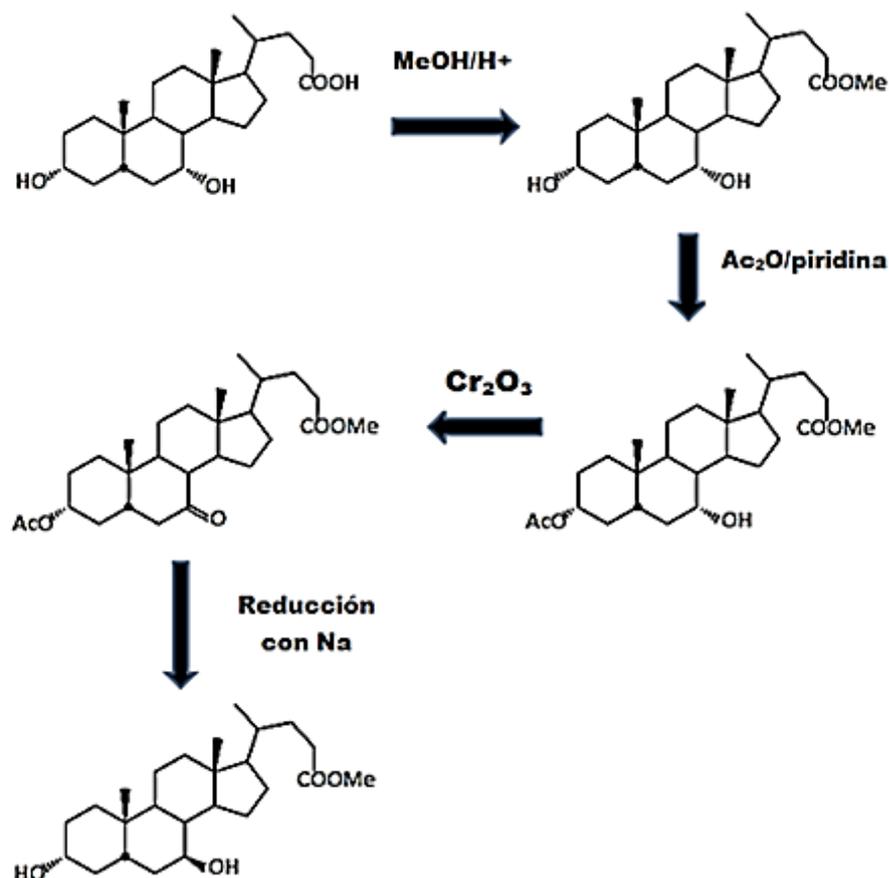
Esta conversión (figura 10) requiere una serie de reacciones similares a las anteriores:

- 1) La esterificación con metanol y formación de metilcolato;
- 2) La acetilación regioselectiva con piridina y anhídrido acético del oxidrilo en la posición C-3;

3) La oxidación en C-7 con CrO_3 ;

4) Reducción del grupo cetona estereoselectiva en C-7 con Na.

Figura 10. Obtención de ácido ursodesoxicólico a partir de ácido quenodesoxicólico



Fuente: Maldonado, 2013

Al haber descrito la síntesis orgánica para la obtención de los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico a partir de taurinatos y glicinatos de ácido cólico, se puede concluir que es un proceso largo, complicado y peligroso, debido a la naturaleza y la toxicidad de los reactivos utilizados y procesos de purificación necesarios para eliminar los subproductos que se forman en cada etapa de reacción (Maldonado, 2013).

Por estos motivos, en la actualidad, la investigación se orienta hacia métodos de síntesis menos costosos, ecológicos y seguros para los operadores.

Una de las opciones constituye las biotransformaciones, que han sido exitosamente utilizadas para mejorar la selectividad y para reducir la serie de procedimientos necesarios para la obtención de los ácidos quenodesoxicólico o ursodesoxicólico.

De tal manera que utilizando la capacidad de los microorganismos para modificar las moléculas esteroides, además de las ventajas ya mencionadas también podemos aprovechar los productos de desecho, que se generan durante la síntesis química, entre ellos los ácidos biliares como el ácido dehidrocólico y cólico.

1.3. La biotransformación

Las biotransformaciones implican el uso de microorganismos que a lo largo de la historia, han demostrado tener la capacidad para modificar químicamente una amplia variedad de compuestos orgánicos de una forma muy específica. Por ejemplo, algunas vitaminas, antibióticos, aminoácidos y hormonas esteroides se obtienen mediante procesos de biotransformación (Bartolini, Medici, & Poli, 1997).

El uso de las biotransformaciones puede considerarse un complemento racional a la síntesis orgánica debido a que presentan numerosas ventajas comparativas con respecto a los procesos químicos. A continuación se mencionan algunas de ellas:

-La síntesis de las moléculas de esteroides complejos requiere de reacciones muy específicas, y la utilización de microorganismos debe permitir la realización de reacciones de alta regio y estereoselectividad.

-Los microorganismos utilizados para la biotransformación, pueden emplearse para atacar posiciones de las moléculas que no son afectadas por métodos químicos.

-La biotransformación mediante microorganismos se considera un método más eficiente por reducir costos, procedimientos y amigable con el medio ambiente (Jaeger & Eggert, 2004).

1.3.1. Los biocatalizadores

Los biocatalizadores que se emplean en las biotransformaciones son microorganismos, por lo tanto uno de los principales objetivos de la biotecnología es

la búsqueda de cepas bacterianas y fúngicas que contengan enzimas que puedan ser capaces de realizar las bioconversiones de manera más rápida, específica y rentable.

Así, al diseñar un proceso de biotransformación es necesario elegir el uso de enzimas aisladas o células enteras (Carvalho & Fonseca, 2006). A continuación se mencionan las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la utilización de células enteras

Sistema catalítico	Ventajas	Desventajas
Células enteras	No es necesario el agregado ni reciclado de cofactores, ni de coenzimas, ni de co-sustratos.	Equipamiento más complejo y caro.
	Las colecciones de organismos disponibles son mucho más numerosas que las enzimas aisladas comercialmente accesibles.	Complejidad de procesos de purificación.
	Muchas enzimas activas en su ambiente celular no pueden ser aisladas, caracterizadas y mucho menos producidas a niveles comerciales.	Necesidad de manejar mayores volúmenes.
	Facilidad de trabajo.	Mantenimiento de cepas puras por largo tiempo para evitar contaminaciones o detectar mutaciones en el microorganismo.
	Su uso es una tecnología amigable con el medio ambiente.	Se necesita que el o los analistas tengan mucha experiencia en este tipo de trabajos.

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la utilización de enzimas aisladas

Sistema catalítico	Ventajas	Desventajas
Enzimas aisladas	Catalizadores eficientes.	La naturaleza provee de enzimas en una sola forma enantiomérica.
	Exhiben amplia tolerancia de sustrato.	Las enzimas requieren parámetros operacionales que varían en un estrecho rango.
	Funcionan bajo las mismas o similares condiciones.	Las enzimas muestran su mayor actividad biocatalítica en H ₂ O.
	Pueden catalizar un amplio espectro de reacciones.	Muchas enzimas necesitan cofactores.

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

1.3.2. Aspectos técnicos de las biotransformaciones

Requisitos para un proceso biotransformativo:

- El cultivo de microorganismos debe contener las enzimas necesarias para la transformación del precursor al producto.
- El cultivo debe tolerar la adición de precursores (sales de ácidos biliares) y el apareamiento del producto de la biotransformación. En algunos casos, la consecución de una determinada concentración del producto, corre el riesgo de tener efectos negativos o, peor aún, efectos tóxicos contra el cultivo.
- El metabolito obtenido tiene que ser el producto de la biotransformación de las sales biliares por medio de los microorganismos y no del medio de cultivo.
- El microorganismo puede tener un metabolismo muy rápido que no deja que se almacene el producto, en este caso se deben utilizar otras estrategias que consisten básicamente en la adición de una mayor cantidad de sal biliar, para de esta forma

sobresaturarlo y observar cada determinado tiempo lo que sucede (Steck & Constabel, 1974).

Otro aspecto importante de un proceso biotransformativo es la elección de los biocatalizadores a continuación se detallan.

1.3.3. Biocatalizadores

Los principales tipos de biocatalizadores conocidos son:

- **Células en suspensión:** La primera etapa de este método consiste en permitir el crecimiento abundante en un medio de cultivo especial, llamado de crecimiento. Después estas células se separan por centrifugación o filtración para incorporarlas a un segundo medio, el de bioconversión, que no contiene los precursores (Fransen & Walton, 1999).
- **Esporas:** Si se utiliza un hongo como un vector biotransformativo, las esporas aisladas de micelio se utilizan como biocatalizador porque poseen enzimas importantes tanto durante la fase vegetativa como durante la germinación (Fransen & Walton, 1999).
- **Células inmovilizadas:** se refiere a células físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida en el espacio, reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas. Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización las células pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos químicos. Por razones técnicas y económicas la mayoría de los procesos químicos catalizados por células, requieren su reutilización o el continuo uso de biocatalizadores durante largos períodos de tiempo. Bajo esta perspectiva, la inmovilización debería ser definida como una técnica capaz de reutilizar o dar uso continuo a biocatalizadores y células (Bardy & Koutinas, 1994).

- **Preparados enzimáticos:** al sustrato se le añaden enzimas. Una condición indispensable para recurrir a este método es que la enzima debe separarse y purificarse con cierta facilidad, o bien estar disponible en forma comercial. El uso de estas enzimas puede ser en su forma libre o inmovilizada sobre soportes poliméricos. Se utilizan para evitar reacciones indeseadas como la degradación de productos y permiten incrementar la velocidad de reacción. Además admiten la especificidad de sustrato (Bardy & Koutinas, 1994).

1.3.4. Reacciones químicas que intervienen en las transformaciones microbianas

Como se mencionó anteriormente, el interés de esta investigación es encontrar microorganismos que sean capaces de realizar la conversión de los ácidos biliares presentes en la bilis de especies bovina y porcina (por ejemplo ácido cólico y ácido dehidrocólico) en ácido quenodesoxicólico y ácido ursodesoxicólico. Las reacciones que permiten estas transformaciones son las de epimerización, oxidación, reducción, hidroxilación y la deshidroxilación. A continuación se detallan cada una de ellas.

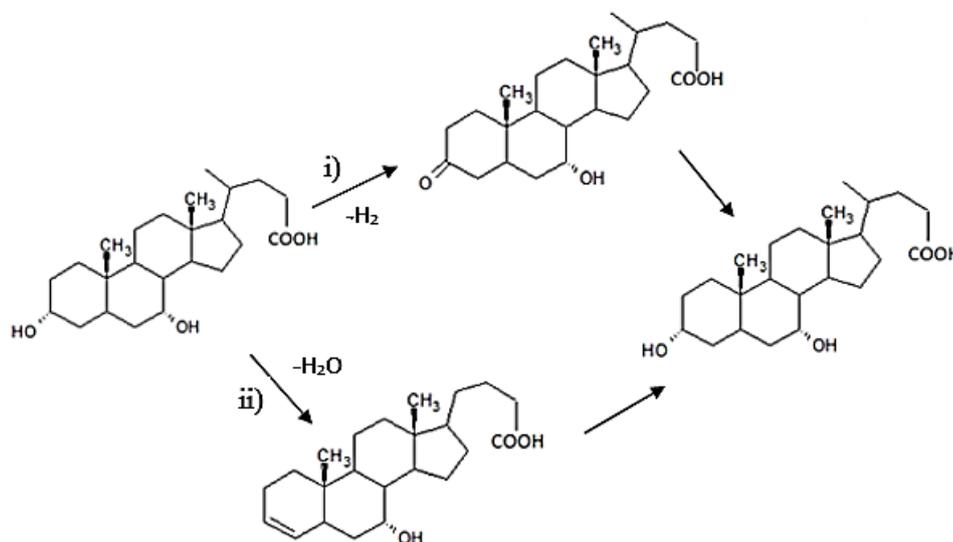
1.3.4.1. Epimerización

Entre las transformaciones realizadas por microorganismos en los ácidos biliares, la epimerización de las funciones hidroxilo se ha estudiado particularmente en relación con la preparación de ácido ursodesoxicólico. La epimerización de los grupos hidroxilo en C₃, C₇, y con menor frecuencia, en C₁₂; representa uno de los mecanismos más comunes para metabolizar ácidos biliares. Esta reacción es una inversión de la estereoquímica en el sitio específico de carbono, sin ningún cambio en el estado de oxidación, que puede ocurrir a través de dos mecanismos. El primero es el más común y consiste en la oxidación de la función hidroxilo con formación de un ceto-derivado y una posterior reducción. Mientras que para la epimerización del C₃ se reporta un mecanismo que consiste en una deshidratación, con formación de un alqueno y sucesiva rehidratación (Fedorowski, Salen, Tint, & Mosbach, 1979).

La epimerización del hidroxilo en C₇, constituye un paso clave para la síntesis de ácido ursodesoxicólico y se realiza por el mecanismo óxido-reductor teniendo como intermediario el ácido 7-cetolitolcólico, o por deshidroxilación con formación de

ácido litocólico y siguiente β -hidroxilación (Aragozzini, Canzi, Ferrari, Maconi, & Sidjimov, 1985).

Figura 11. Mecanismos propuestos para la reacción de epimerización en C-3 de ácido quenodesoxicólico.

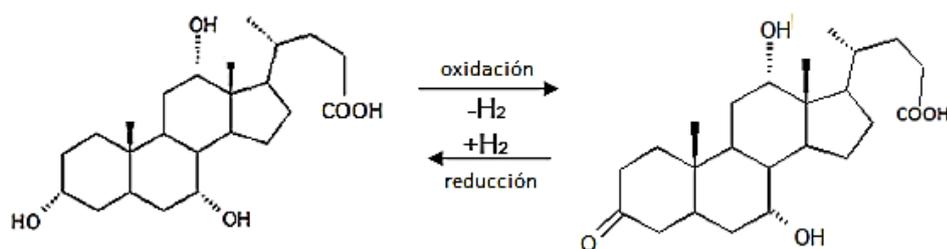


Fuente: Medici, Bartolini, & Poli, 1997

1.3.4.2. Oxidación

Esta reacción está estrictamente relacionada con la reducción, se caracterizan por un cambio en el estado de oxidación y generalmente ocurren a través de una expulsión formal o inserción de H, es decir el mecanismo de deshidratación-rehidratación. Las reacciones de oxidación más estudiadas para sintetizar ácido ursodesoxicólico, son las que implican la posición del C7 y C12 y conducen a compuestos claves, tales como el ácido cetolítico y 7-12-cetoquenodesoxicólico (Chinaglia, Dean, Giovannini, Medici, Pedrini, & Poli, 1999).

Figura 12. Reacciones de oxidación y reducción.

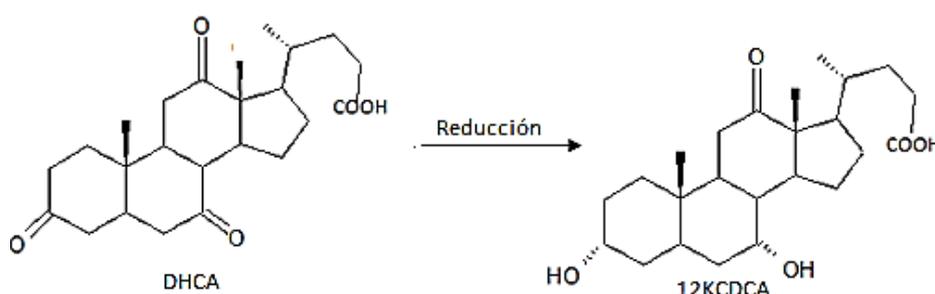


Fuente: Medici, Bartolini, & Poli, 1997

1.3.4.3. Reducción

Esta es una de las reacciones de mayor interés, ya que permite la conversión de ácido dehidrocólico (DHCA) a 12-cetoquenodesoxicólico a través del ácido 7,12-dicetolitolcólico como un intermediario. Se han encontrado dos tipos de bacterias capaces de realizar esta transformación, identificadas como *Brevibacterium fuscum* y *Lactobacillus xylosus*. Este producto de la conversión fue obtenido con un rendimiento del 50 %. La bioconversión en presencia de *Lactobacillus xylosus* se ha optimizado produciéndola en un fermentador continuo de dos etapas mediante el ajuste del pH y la tasa de dilución, obteniendo un rendimiento del 55% (Sawada, Kinoshita, & Taguchi, 1981).

Figura 13. Reducción de ácido dehidrocólico a 12-cetoquenodesoxicólico

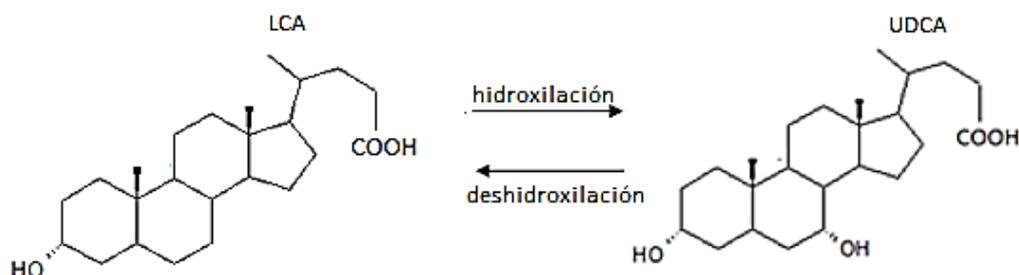


Fuente: Medici, Bartolini, & Poli, 1997

1.3.4.4. Hidroxilaciones

Esta reacción ocurre a través de la sustitución de un hidrógeno con un grupo hidroxilo o viceversa, y se caracteriza por un cambio en el estado de oxidación reactivo-producto. En la literatura se reporta un hongo denominado *Fusarium equiseti* aislado del suelo que es capaz realizar la transformación de LCA a AUDC en un solo paso (Sun & Fa, 1995), como se muestra en la figura 14.

Figura 14. Reacciones de hidroxilación y deshidroxilación.



Fuente: Medici, Bartolini, & Poli, 1997

1.3.4.5. Deshidroxilación

La 7 α -deshidroxilación primaria de CA y CDCA para producir los correspondientes ácidos biliares secundarios, ácido desoxicólico y ácido litocólico, se considera una de las biotransformaciones más importantes de esta clase de compuestos, siempre vista en perspectiva de una hidroxilación posterior que conduce a epimerización de la posición C-7. En la literatura se han reportado unas pocas cepas que podrían deshidroxilar el CA en la posición C – 7, en particular esta actividad se observó en *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium*, y en muchas cepas de *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus* (Hill & Drasar, 1968).

1.4. Técnicas metodológicas

1.4.1. Análisis de cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor) (Douglas, Skoog, Stanley, Crouch, & James, 2008).

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas, mientras que la estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de

adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía (Douglas, Skoog, Stanley, Crouch, & James, 2008).

1.4.2. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN), puede ser considerada como una herramienta que permite obtener una gran cantidad de información sobre la estructura molecular y estereoquímica en un tiempo asequible. La técnica tiene aplicaciones en todas las áreas de la Química, Farmacéutica, Biología, entre otras.

La RMN es una espectroscopia de absorción que tiene como fundamento la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Las partes fundamentales de un espectrómetro de RMN son: un imán; una bobina superconductora que suministra el campo magnético principal; un oscilador de radiofrecuencias que suministra la energía necesaria para cambiar la orientación de los núcleos; una bobina detectora que recibe las señales y un sistema informatizado que gobierna todo el aparato y que incluye un sistema de amplificación y registro (Barnes & Kirk, 1988).

Los espectros más comunes son representaciones de la intensidad de absorción frente a la frecuencia de resonancia (generalmente a través del parámetro δ) y presentan señales cuya posición, forma y tamaño están íntimamente relacionadas con la estructura molecular. El análisis detallado de estos espectros proporciona valiosa información estructural y estereoquímica. Espectros bidimensionales permiten relaciones entre distintos núcleos o distintas magnitudes del mismo núcleo (Barnes & Kirk, 1988).

1.4.3. Identificación del género de los microorganismos

1.4.3.1. Principio de las pruebas bioquímicas de identificación de las bacterias

El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de ensayo de micropocillos separadas (GNA y GNB). Cada tira de prueba tiene 12 sustratos bioquímicos

estandarizados, que han sido seleccionados en función de análisis informático muy extenso de la base de datos publicados, para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y los microorganismos Gram negativos, oxidasa positivos y negativos no exigentes más comunes. Los sustratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una solución salina del organismo a identificar. Si los sustratos son metabolizados por el organismo, se observa un cambio de color durante la incubación o después de la adición de los reactivos específicos. La permutación de los sustratos metabolizados se puede interpretar mediante el Software Microgen (MID-60) para identificar el organismo de prueba.

Las tiras de GN A han sido diseñadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivos que incluyen los géneros más comunes de la familia *Enterobacteriaceae*. El kit se ha diseñado solo para uso profesional. Este sistema de identificación tiene un porcentaje de efectividad del 99% (Microgen Bioproducts Ltd, 2004).

1.5. Descripción de los medios de cultivo

El caldo de cultivo Plate Count Broth (PCB) es un medio de uso general no selectivo para determinar los recuentos bacterianos a partir de muestras de aguas, alimentos y otros. Es un medio mínimo que favorece el crecimiento solo de bacterias que sirven para evaluar la sensibilidad del microorganismo ante el caldo de cultivo. (Neogen Corporation, 2010).

El caldo de cultivo Sabouraud Dextrosa Broth (SDB) se utiliza para el cultivo de hongos y levaduras patógenas y comensales. La alta concentración de dextrosa y pH ácido de las fórmulas permite la selectividad de los hongos, también se utiliza para la determinación de la actividad fungistática en la industria farmacéutica, alimentos, bebidas, y de cosméticos (BD, 2009).

1.6. Objetivos

1.6.1. General:

- Evaluar la capacidad de biotransformación de las sales de ácidos biliares colato y dehidrocolato de sodio, mediante microorganismos obtenidos en áreas de faenamiento de ganado bovino y porcino.

1.6.2. Específicos:

- Seleccionar los microorganismos capaces de biotransformar las sales de ácidos biliares: colato y dehidrocolato de sodio, mediante cromatografía en capa fina.
- Identificar microorganismos de interés mediante tinción de Gram y test de pruebas bioquímicas.
- Identificar algunos de los metabolitos resultantes de la biotransformación mediante técnicas de resonancia magnética nuclear.

1.7. Hipótesis

1.7.1. Hipótesis alternativa

- Al menos uno de los microorganismos biotransforman las sales de ácidos biliares (dehidrocolato y colato de sodio).

1.6.2. Hipótesis nula

- Los microorganismos no biotransforman las sales de ácidos biliares (dehidrocolato y colato de sodio) en metabolitos secundarios que puedan ser de interés.

CAPÍTULO II.

MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPOS

2.1. Fase de muestreo y análisis

En la presente investigación fue necesario determinar las zonas de muestreo que brindaban mejores posibilidades, para la obtención microorganismos con alta capacidad de biotransformación. Para delimitarlas se tomó en cuenta los siguientes aspectos:

- Ubicación de la zona de muestreo: la zona a muestrear tenía que estar cerca del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), ya que los microorganismos debían ser mantenidos a una temperatura adecuada para su preservación.
- Manejo de los residuos: Las zonas a muestrear tenían que ser de preferencia lugares contaminados, en donde no se realizan controles estrictos de higiene y ambientales, con el objeto de favorecer el muestreo de microorganismos que tengan la capacidad de habitar en estos lugares, que podrían ser capaces de realizar la biotransformación de las sales de ácidos biliares: colato y dehidrocolato de sodio.

En función de las condiciones previamente planteadas, se escogieron los camales de Latacunga y Cayambe que presentaban las mejores características para realizar el muestreo.

2.1.1. Delimitación de lugares de estudio

El Camal Municipal de Latacunga (Provincia de Cotopaxi) se encuentra ubicado a 89 Km de la ciudad de Quito, las muestras fueron tomadas durante el mes de Octubre de 2010, mientras que el Camal Municipal de Cayambe (Provincia de Pichincha) se encuentra ubicado a 78 Km de la Ciudad de Quito, la toma de muestras se realizaron durante el mes de Diciembre del 2010.

2.1.2. Materiales y método para el muestreo en los lugares de faenamiento

2.1.2.1. Materiales

- Autoclave marca Phoenix luferco, modelo AV-50
- Shaker marca New Brunswick Scientific modelo Excella E24
- Placas de silica gel 60F254 marca Merck
- Centrifugadora marca Hermle, modelo Z400
- Rota vapor marca Tecnal modelo TE-210

2.1.2.2. Camal Municipal de Latacunga

Se definieron las siguientes áreas de muestreo:

A1 – Cubículo para la recolección de cabezas, patas y piel. Una habitación con paredes cubierta con baldosas blancas y suelo de mármol, ubicada junto al área inicial de la cadena de transporte animal.

A2 - Zona de procesamiento de las vísceras: en este lugar se realizó el muestreo de los recipientes de plástico con el contenido del estómago, mesa de recepción de las vísceras, piso y paredes.

A3 - Área de corte del ganado: en esta área las muestras fueron tomadas en el canal de agua: estos canales, recorren internamente el área de procesamiento y recolección de vísceras.

Zona exterior: las muestras fueron tomadas de la fosa exterior que recoge el agua que sale del matadero, las cuales son recogidas en un pozo, que posteriormente se descarga al río.

Para la asignación del código se hizo un diagrama del camal en los lugares donde se tomaron las muestras, que se encuentra disponible en el Anexo 1.

2.1.2.3. Camal Municipal de Cayambe

Se definieron las siguientes áreas de muestreo:

A1 – Cubículo para la recolección de cabezas, patas y piel. Una habitación con paredes cubierta con baldosas blancas y suelo de mármol, ubicada junto al área inicial de la cadena de transporte animal.

A2- Zona de recolección de vísceras.

A3- Canales de agua internos de la planta.

A4- Zonas externas alrededor del camal: muestra de la fosa exterior que recoge el agua que sale del pozo de descarga.

2.1.3. Procedimiento de recolección de muestras y aislamiento de bacterias

Para la toma de muestras se prepararon tubos de ensayos estériles, con 5 ml de solución fisiológica con un hisopo de algodón en cada tubo.

El muestreo se realiza dando prioridad a las zonas del camal en donde se encuentran las vísceras, en especial la vesícula biliar, que al ser lugares no estériles favorecen la presencia de microorganismos que pueden tener la capacidad para biotransformar estructuras esteroides.

Para la toma de las muestras, se pasa un hisopo estéril de algodón por la superficie y luego se coloca el hisopo con la muestra dentro de la solución fisiológica, hasta que este sumergido por completo y se cierra el tubo.

Las muestras tomadas en el Camal Municipal de Latacunga fueron transportadas hacia la ciudad de Quito (89 km al norte de Latacunga) en un cooler, manteniéndolas a una temperatura de 4 °C, en similares condiciones se trasladaron las muestras tomadas en el Camal Municipal de Cayambe.

Luego las muestras son llevadas a los laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana, en donde se las mantiene en refrigeración a una temperatura de 0 °C.

Posteriormente se realizó una serie de diluciones seleccionando la dilución 10^{-4} por ser la que permite aislar los microorganismos, a continuación se siembran las bacterias en cajas Petri en la cámara de flujo laminar, en el medio Plate Count Agar (PCA) Difco, al que se le añadieron sales de ácidos biliares, en concentración de 5 g/l para aislar sólo aquellas bacterias que pueden crecer en medios que contienen sales de ácidos biliares.

Después de 24 horas de crecimiento a 30 °C, las bacterias aisladas se siembran en nuevas cajas Petri que contienen el mismo medio (pero sin la sal de ácido biliar), hasta el aislamiento de las cepas.

Para los hongos de igual manera se realiza un serie de diluciones escogiendo la dilución 10^{-4} por ser la mejor para el aislamiento de los microorganismos, posteriormente se siembran en cajas Petri, que contienen agar dextrosa Sabouraud (Difco) mas 0.1g/l de concentración de cloranfenicol, para evitar el crecimiento de bacterias y contaminación cruzada de otros microorganismos que no sean hongos y se añaden las sales de ácidos biliares en concentración de 5 g/l, para aislar solo aquellos hongos que crezcan en estas condiciones.

Después de 7 días de incubación a temperatura ambiente en las cajas Petri se analizan los hongos aislados y se realizan las resiembras necesarias en las nuevas cajas hasta el aislamiento de las cepas.

Para la toma de muestras en Cayambe se siguió la misma metodología antes descrita. Y el diagrama de las instalaciones se encuentra en el anexo 2.

2.2. Screening de la capacidad de biotransformación de los microorganismos mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC)

Se preparan erlenmeyers con 10 ml del medio de cultivo Plate Count Broth (PCB), los cuales se esterilizan en el autoclave a 121 °C por 15 minutos, a 1 atmosfera de presión. En la cámara de flujo laminar, se siembran las cepas anteriormente aisladas en el medio de cultivo preparado, cuando está a temperatura ambiente.

Los inóculos así obtenidos se mantienen en agitación entre 100-120 rpm, durante 48 horas a 30 °C en el shaker, con el fin de que las bacterias crezcan adecuadamente y para tener una producción de biomasa homogénea.

Luego se administran a las 48 horas los ácidos biliares como una solución acuosa de su sal: colato y dehidrocolato de sodio (0,1 ml de solución al 10% peso/volumen), usando de manera independiente cada sal biliar en los medios antes preparados. Dejando el cultivo en agitación por 24 horas en las mismas condiciones anteriormente citadas.

Después de las 24 horas de haber adicionado las sales de ácidos biliares: colato y dehidrocolato de sodio, se toma una muestra de 200µl. Posteriormente se ponen las muestras en un tubo eppendorf independiente, añadiendo 200µl de ácido clorhídrico 0.1 Molar, para protonar la sal de ácido biliar y así liberar el ácido biliar,

consecutivamente se añade 200µl de acetato de etilo para extraer el ácido biliar más los productos de biotransformación, seguidamente se recupera la fase de acetato de etilo que contiene el producto de la biotransformación y se realiza cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de silica gel. La fase móvil que se emplea en la cromatografía es una combinación de solventes como: acetato de etilo, hexano, ácido acético glacial, en función de polaridad de las muestras obtenidas.

En seguida se corta la placa de cromatografía señalando con un lápiz (2cm del borde inferior de la placa), el lugar en donde se colocará el estándar y las muestras respectivamente, y se procede a sembrar el estándar en el lugar designado con un capilar de dos a tres veces lavándolo con acetato de etilo al finalizar, a continuación se siembran las muestras aproximadamente 4 veces en cada sitio asignado, lavando el capilar con acetato de etilo al cambiar de muestra. Después se coloca la placa en la fase móvil escogida, para que la misma corra hasta 1cm antes del borde superior de la placa cromatográfica.

Inmediatamente secar la placa con la ayuda de calor y con el nebulizador rociarla en la sorbona con una solución que contiene ácido fosfomolibdico ($H_3Mo_{12}O_{40}P$), ácido sulfúrico y ácido acético en proporciones 2.5:2.5:5 para después calentarla (aproximadamente a 120 °C) con el fin de hacer visibles los productos de la reacción.

Repetir la técnica antes descrita a las 24, 48 y 72 horas, dependiendo del proceso de biotransformación, luego de haber administrado la sal de ácido biliar.

En el caso de los hongos se tiene que continuar con la misma metodología detallada anteriormente para las bacterias pero con las siguientes modificaciones:

Se preparan 20 ml de Sabouraud Dextrose Broth (SDB), manteniendo la misma concentración de sal de ácido biliar que se usó con las bacterias y el monitoreo del proceso de biotransformación se realiza hasta las 144 horas.

2.3. Elección de microorganismos con capacidad para biotransformar las sales de ácidos biliares (colato y dehidrocolato de sodio)

Una vez realizado el screening microbiológico, se toman las cepas de interés en las cuales se evidencia biotransformación. A continuación se detallan las bacterias que

fueron escogidas para realizar el escalamiento de cultivo, para la resonancia magnética nuclear.

Las bacterias escogidas para la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio fueron: MM B30, MM B42, MM B25, MM B37 y para la sal de ácido biliar colato de sodio: MM B26, MM B35, MM B37, MM B54, MM B27.

2.4. Escalamiento de cultivo de bacterias y hongos

De los microorganismos anteriormente elegidos, que presentan una capacidad biotransformativa interesante, se hace el escalamiento de cultivo a fin de obtener una mayor cantidad de muestra y poder apreciar los productos de biotransformación en las pruebas cromatográficas (TLC) y espectroscópicas.

Para ello se siembran en 10 ml de medio de cultivo PCB, las bacterias de interés, con agitación a 30 °C, durante 48 horas, tiempo en el cual los microorganismos llegan a su fase estacionaria.

Luego de 48 horas de incubación, se transfieren en condiciones de esterilidad el volumen total del inóculo a 100 ml de PCB y se deja en agitación durante 72 horas en el shaker, para obtener una mayor cantidad de biomasa en la que se encuentran los productos de biotransformación, que se van a evaluar.

Luego de 72 horas, se administran 200 mg de la sal de ácido biliar y transcurridas las 24 horas, se inicia el seguimiento del proceso de biotransformación, mediante la técnica de TLC antes descrita.

La metodología aplicada para la extracción de los productos de biotransformación se fundamenta en los mismos principios de extracción de la fase de screening, pero se deben tomar ciertas consideraciones en función del mayor volumen en el que se trabaja. La separación de los microorganismos se realiza en una centrífuga a 3500 rpm durante 25 minutos, obteniendo un líquido sobrenadante que es colocado en un embudo de separación, al que se le añade 1ml de HCl, para obtener un pH ácido (0-4), posteriormente se añaden 150 ml de acetato de etilo y se agita el embudo de separación aproximadamente 80 veces, sacando el aire periódicamente, luego se deja en reposo para observar la separación de las dos fases.

Al haberse separado las dos fases, se coloca la fase acuosa en un recipiente de vidrio y se añaden 50 ml de acetato de etilo a la fase orgánica que se encuentra en el embudo de separación para volverlo a agitar hasta que no queden residuos acuosos.

Después se coloca el contenido del embudo de separación en un vaso de precipitación y se añade sulfato de sodio anhidro para eliminar cualquier residuo de agua. A continuación se filtra y lleva a seco la muestra que contiene acetato de etilo más el producto de biotransformación en el rota vapor a una temperatura máxima de 40 °C y finalmente se trata el producto remanente con gas nitrógeno para eliminar el resto de acetato de etilo que no fue evaporado en el rotavapor. De esta manera se tienen las muestras listas para realizar el análisis de resonancia magnética nuclear (RMN).

Los análisis de RMN se realizaron en la Universidad de Ferrara en Italia, con el equipo Varian Gemini - 300 (300 MHz): que reporta los desplazamientos químicos en ppm. Las resonancias se encuentran en los anexos N.42, N.43, N.44, N.45

2.5. Identificación de bacterias

2.5.1. Tinción de Gram

Para la tinción de Gram se siguió la metodología diseñada por Christian Gram:

- En un porta objetos bien limpio (con alcohol y flameado), se coloca una gota de agua destilada y con la ayuda del asa de siembra, previamente esterilizada a la llama se toma el inóculo de la bacteria.
- Se extiende con el asa la gota y la bacteria sobre el porta objetos, fijando la extensión con calor, suavemente a la llama del mechero hasta secar.
- Luego se añade cristal violeta (tiñe todas las bacterias, Gram + y Gram -) a la muestra y se lo deja por 1 minuto inmediatamente, se lava con agua destilada y se seca en el mechero.
- Después se añade el lugol (mordiente) dejándolo 1 minuto, seguidamente se seca y después se lava con alcohol al 95% para decolorar (Gram-) y finalmente con agua destilada.
- Posteriormente se añade fucsina (colorante de contraste) por 1 minuto, se lava con agua destilada y se seca en el mechero.

- Una vez totalmente seca la muestra añadir una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio en el objetivo de inmersión (100X) anotando los resultados.

2.5.2. Pruebas bioquímicas

Se escogieron cuatro bacterias respectivamente capaces de biotransformar las sales de ácidos biliares colato y dehidrocolato sodio, del total de cepas analizadas, que presentaban los mejores porcentajes de biotransformación para posteriormente identificarlas mediante el sistema Microgen GN-ID que utiliza 12 substratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no-exigentes Gram negativos (oxidasa negativos y positivos) (Microgen Bioproducts Ltd, 2004). El kit se ha diseñado solo para uso profesional, para lo cual se ha seguido el protocolo desarrollado por dicha empresa que indica lo siguiente:

- Elegir una colonia para la identificación. Distribuir la colonia en 5ml de solución fisiológica estéril hasta llegar a una densidad óptima de 0.5 MacFarland, agitar para homogenizar la muestra.
- Añadir 3-4 gotas (~100µl) de la suspensión a cada pocillo con la ayuda de una pipeta estéril. Los pocillos deben estar llenos al 30-40%; demasiado inoculo imposibilitará la adición de reactivos.
- Cubrir los pocillos indicados con aceite mineral en los pocillos que están marcados con una línea negra. La cantidad apropiada es de 3-4 gotas en cada uno y después cerrar herméticamente con la cinta adhesiva.
- Llevar a una incubadora de 18-24 horas a 37°C, para la prueba de oxidasa (+) esperar hasta 48 horas. Después de la incubación añadir los reactivos (Indole-Kovacs, VPI VPII, TDA, Nitrates A/B).
- Realizar la interpretación de los resultados con la tabla de colores proporcionada por la misma empresa, observando los colores en los pocillos de las pruebas bioquímicas y registrar los resultados en los formularios. Usar para el análisis de los resultados el programa MID-60 proporcionado por la empresa, el software proporciona una identificación basada en % de probabilidad y en el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. Los resultados del programa están en los anexos N.34, N.35, N.36, N.37, N.38, N.39, N.40, N.41

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Situación de los camales en el Ecuador

Como parte de la presente investigación se realizó un estudio para evidenciar el manejo ambiental que realizan los camales del Ecuador en cuestión de residuos líquidos y sólidos, generados en las labores de faenamiento. Otro de los objetivos era determinar zonas idóneas para el muestreo de microorganismos, que podrían tener la capacidad de biotransformar las sales de ácidos biliares colato y dehidrocolato de sodio.

De esta manera se tendrían los mejores lugares de muestreo para futuras investigaciones, dentro del campo de la biotransformación de compuestos esteroides.

3.1.1. Antecedentes

Históricamente, el sector agropecuario ha desempeñado un rol protagónico en el desarrollo económico de nuestro país y todo parece indicar que en el futuro su participación podría incrementarse, principalmente ante la reducción paulatina de los ingresos generados por el petróleo y por el rápido crecimiento que están experimentando los productos agrícolas de exportación tradicionales y no tradicionales, e indudablemente el sector pecuario (Flores, 2009).

El Ecuador cuenta con más de 200 mataderos localizados, 45% en la Sierra, 38% en la Costa y 17% en la Región Amazónica y Galápagos. La mayoría están administrados por los municipios; el 81% de los mataderos están ubicados en áreas urbanas, 7% en semiurbanas y 12% son rurales (MAGAP, 2009).

Aproximadamente un 20% a 50% del animal dependiendo del tipo, no es apto para el consumo humano, todos estos desechos generados en la matanza de los animales pueden ser sometidos a variados procesos, de los cuales se derivan una serie de productos finales, en algunos casos, útiles en la alimentación animal, en la industria

química, farmacéutica y biotecnológica. De otra parte, un uso adecuado de estos residuos y desechos favorecen la preservación del ambiente (Falla, 2009).

Por tal motivo es de interés investigar la situación ambiental en algunos de los principales camales del Ecuador, para recoger información que pueda ser utilizada para tomar medidas correctivas en el tema de manejo de residuos en estos lugares. Los camales que se investigaron se encuentran en: Quito, Latacunga, Cayambe, Ambato, Riobamba, Esmeraldas (San Mateo), Pedernales, Guayaquil y Antonio Ante y a continuación se encuentra la información de cada uno de ellos.

3.1.2. Camal Municipal de Riobamba

3.1.2.1. Lugar de investigación

- Provincia: Chimborazo
- Cantón: Riobamba

3.1.2.2. Ubicación

Se encuentra ubicado en la Avenida Leopoldo Freire junto al Mercado Mayorista de productos agrícolas en una zona densamente poblada.

3.1.2.3. Tipo de líneas que se manejan

El Camal Municipal de Riobamba, ofrece a la ciudadanía servicios de recepción de animales de corral en reposo, custodio de animales hasta el faenamiento, labores de faenamiento propiamente dichas, inspección sanitaria ante y post mortem, en líneas de bovinos, ovinos y porcinos que abastecen al mercado local, intercantonal e interprovincial.

3.1.2.4. Volúmenes aproximados de faenamiento

El número de ganados faenados en la actualidad, es de 120 a 130 bovinos, 350 porcinos y 350 ovinos por día, esta actividad se la realiza durante cuatro días a la

semana (miércoles, jueves, viernes y sábado) dando una producción mensual de 2500 reses (Chacón, 2012) .

3.1.2.5. Impacto ambiental

Al visitar el Camal Municipal de Riobamba se constató que el único residuo que recibe un tratamiento posterior para la comercialización es la sangre de ganado vacuno, con ésta se elabora harina de sangre para balanceado de animales, todos los demás residuos líquidos son vertidos a la alcantarilla sin realizar un tratamiento previo, en cuanto a los residuos sólidos son llevados en volquetas hacia el botadero de la ciudad.

3.1.2.6. Manejo de la bilis en el Camal Municipal de Riobamba

Luego de haber realizado la visita al Camal Municipal de Riobamba se pudo evidenciar que solo se recolecta la bilis de ganado vacuno para su posterior venta en crudo, sin ningún proceso previo.

Para conocer la cantidad de bilis que posee cada animal, se realizó la toma de muestras de bilis de ganado vacuno de 10 reses bovinas, tomando en consideración un peso aproximado de 400 libras, con lo que se pudo observar que existe un rango de entre 150 ml – 500 ml de bilis recolectada de cada animal. Los valores obtenidos se detallan a continuación en la siguiente tabla de resultados.

Tabla 4. Cantidad de bilis de las reses.

No. de res	CANTIDAD DE BILIS/LITROS	No. de res	CANTIDAD DE BILIS/LITROS
1	0,25	6	0,30
2	0,15	7	0,30
3	0,45	8	0,35
4	0,01	9	0,05
5	0,15	10	0,42
PROMEDIO: 0,243 LITROS			

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Para sustentar la investigación el aporte y la experiencia del Dr. Alex Chacón fue de gran ayuda, al proporcionar datos de muestreos realizados para determinar el contenido de bilis en las vesículas biliares de 100 reses, teniendo un promedio de 250 ml de bilis por res.

El Dr. Alex Chacón comentó que los factores más importantes, para tener una alta o baja cantidad de bilis se deben principalmente a: si el animal ha comido horas antes o si el animal ha estado en ayuno, si no ha comido se obtiene una mayor cantidad de bilis, en caso contrario se obtendrá una cantidad menor.

Otro de los factores es el descanso de las reses previo al faenamiento, reses que han estado en reposo antes del faenamiento se encuentran con menores cantidades de bilis en cambio reses que no han tenido un reposo previo tiene mayores cantidades de bilis.

En este camal se recolectan mensualmente un aproximado de 2 tanques y medio de 220 litros cada uno de bilis, cada tanque se comercializa a una empresa ubicada en Santo Domingo a un valor de 50 dólares, se desconocen las actividades posteriores de tratamiento que se le da a la bilis luego de haber sido vendida por el camal (Chacón, 2012).

3.1.3. Camal Municipal de Ambato

3.1.3.1. Lugar de investigación

Provincia: Tungurahua.

Cantón: Ambato

Parroquia: Izamba

Sector: Parque industrial

3.1.3.2. Ubicación

Está ubicado en la zona norte de Ambato, forma parte de la corporación de empresas del Parque Industrial de Ambato.

3.1.3.3. Tipo de líneas que se manejan

El Camal Frigorífico Municipal de Ambato, ofrece a la ciudadanía, labores de faenamiento propiamente dichas en líneas de ganado vacuno, porcino y en ocasiones ganado lanar (chivos, llamingos).

3.1.3.4. Volúmenes aproximados de faenamiento

Se faenan alrededor de 2500 reses mensualmente y un aproximado de 150 animales de ganado porcino; el 15% es para consumo local en provincias centrales del país, el restante que representa el 85% se transporta a la Provincia del Guayas (Ortiz, 2012).

3.1.3.5. Impacto ambiental

El Camal Municipal de Ambato produce aproximadamente 7 m³ de rumen diarios, de 12 a 15 litros de sangre por animal. No existen datos de los demás desechos que se producen, ya que son enviados en volquetas al botadero sin contabilizar la cantidad y los remanentes líquidos incluida la sangre.

Con respecto a los desechos, en este camal no se los procesa y son eliminados hacia el botadero o hacia la alcantarilla sin realizar ningún tratamiento, pero los desechos que son vertidos hacia la alcantarilla posteriormente llegan a una planta de tratamiento del municipio en donde se los trata y se produce abono para drenar los terrenos agrícolas del sector (Ortiz, 2012).

3.1.3.6. Manejo de la bilis en el Camal Municipal de Ambato

En este lugar se realizan muestreos para determinar la cantidad de bilis, que se obtiene de la vesícula biliar del ganado vacuno desde el mes de agosto de 2012, el promedio que se ha obtenido es de 0,194 Litros (199,4) ml de bilis por res. Los valores están comprendidos entre los 0,01 litros a 0,50 litros (Ortiz, 2012).

Técnicamente no es posible emitir un valor exacto de la cantidad de bilis existente en la vesícula biliar de los bovinos ya que depende de factores como son: edad, sexo, raza, alimentación, hábitat, descanso en corrales, disponibilidad de agua (Ortiz, 2012).

La bilis es recolectada en tanques de 220 Litros que posteriormente se comercializan a 85 dólares cada uno. Aproximadamente cada mes se producen 3 tanques de 220 Litros de bilis vacuna, es decir, una cantidad aproximada de 660 Litros, los mismos

que son vendidos a un comprador colombiano, que después produce pasta de bilis que es comercializada en el exterior.

3.1.4. Camal Municipal de Pedernales

3.1.4.1. Lugar de investigación

Provincia: Manabí

Cantón: Pedernales

3.1.4.2. Ubicación

Las instalaciones del camal están ubicadas en el kilómetro 5,5 de la vía que conduce a San Vicente.

3.1.4.3. Volúmenes aproximados de faenamiento

El Camal Municipal de Pedernales ofrece a la ciudadanía servicios de custodio de animales hasta el faenamiento. Su diseño establece áreas de faenamiento de ganado porcino y bovino que abastecen al mercado local e intercantonal.

Los volúmenes aproximados de faenamiento semanal para bovinos son de 26 y para porcinos es de 50, estos valores van a variar durante todo el año dependiendo de la demanda (Chavez, 2012).

3.1.4.4. Impacto ambiental

Los desechos líquidos como la sangre son almacenados en una cisterna. Diariamente pasa un tanquero y se lleva la sangre al botadero de este lugar o se la evacua en los afluentes más cercanos. Los desechos sólidos son recogidos diariamente por una volqueta que de igual forma lleva todos los residuos al botadero municipal.

El botadero municipal a campo abierto funciona a 16 km de la ciudad, vía a Jama, a 2 km antes de El Palmar. No existe relleno sanitario, los desechos son enterrados. Como es sabido, esto se convierte en un foco de infecciones, contaminación ambiental y enfermedades.

3.1.4.5. Manejo de la bilis en el Camal Municipal de Pedernales

Luego de realizar una entrevista al Sr. Luis Chávez encargado del Camal Municipal de Pedernales se constató que la bilis proveniente de las labores de faenamiento de ganado bovino y porcino no tiene ningún tratamiento posterior, es decir, no se comercializa ni se utiliza, simplemente es eliminada junto con los demás desechos. El único desecho que se comercializa es el rumen, que se vende a un costo de 200 dólares el tanque de 220 litros. Aproximadamente se producen 2 tanques diariamente (Chavez, 2012).

En este lugar no existen registros sobre la cantidad de bilis que posee cada res, por tal razón se realizó el muestreo en 10 vacas para tener una idea de la cantidad de bilis que tienen estos animales. Los valores fueron desde los 0,150 Litros hasta los 0,60 Litros, dando un promedio de bilis por res de 0,230 Litros.

3.1.5. Camal Municipal de Guayaquil

3.1.5.1. Lugar de investigación

Provincia: Guayas

Cantón: Guayaquil

3.1.5.2. Ubicación

El Camal Municipal de Guayaquil está ubicado en el barrio Cuba, en una zona densamente poblada.

3.1.5.3. Líneas de faenamiento del Camal Municipal de Guayaquil

Se dedica al faenamiento de ganado bovino y porcino de particulares para su comercialización en mercados de la Provincia del Guayas, fundamentalmente en la Ciudad de Milagro.

3.1.5.4. Volúmenes aproximados de faenamiento.

En el camal se faenan aproximadamente 2000 vacas y 1500 chanchos semanalmente, los valores varían dependiendo de la demanda (Casquete, 2012).

3.1.5.5. Manejo de la bilis en el Camal Municipal de Guayaquil

El Camal Municipal de Guayaquil brinda servicio de faenamiento de ganado bovino y porcino. Las personas que pagan por el faenamiento se llevan absolutamente todos los desechos del animal, es decir, el camal no recolecta la bilis, sino los comerciantes que faenan los animales, aproximadamente se generan 2000 litros de bilis proveniente de ganado vacuno, esta bilis es entregada a los mayoristas o minoristas que han pagado por el servicio de faenamiento. Posteriormente estos la comercializan a empresas como NUNSA (Cevallos, 2012).

Cabe recalcar que en el camal solo se recolecta la bilis de ganado vacuno, no se recolecta la bilis de ganado porcino.

3.1.5.6. Impacto ambiental

Durante el desarrollo de las actividades productivas se generan desechos sólidos y efluentes líquidos, gestionados de la siguiente manera.

- La sangre coagulada, los desechos de la higienización del personal, estiércol, trozos de grasa, pelo, cascos, orejas, colas, cachos, huesos de cabezas y quijadas; son enviados al relleno sanitario.
- El cuero de las reses es retirado por los clientes.

Los efluentes líquidos que contienen sangre, grasa y heces fecales, son vertidos hacia el alcantarillado sin tratamiento previo, solo son filtrados por un tamiz que retiene los residuos sólidos más grandes.

La encargada del área técnica la Dr. Josefa Cevallos indicó que se tiene un promedio de 566.550 kg de desechos semanalmente, estos incluyen la sangre y el estiércol de los animales. Además se obtienen 51,485 osamentas mensualmente. Una res genera en promedio 40 kg de rumen y 10 kg de estiércol, equivalentes a 0,05 m³ en volumen aproximadamente. Los desechos son enviados en contenedores a los botaderos más cercanos (Cevallos, 2012).

3.1.6. Camal Municipal de Esmeraldas (San Mateo)

3.1.6.1. Lugar de investigación

Provincia: Esmeraldas

Cantón: Esmeraldas

Parroquia: San Mateo

3.1.6.2. Ubicación

El Camal Municipal de Esmeraldas se encuentra ubicado en una zona densamente poblada en la Provincia de Esmeraldas específicamente en la Parroquia de San Mateo.

3.1.6.3. Líneas de faenamiento

El Camal Municipal de Esmeraldas ofrece a la ciudadanía servicios de recepción de animales de corral en reposo, custodio de animales hasta el faenamiento, labores de faenamiento propiamente dichas, inspección sanitaria ante y post mortem en líneas de bovinos y porcinos que abastecen al mercado local, intercantonal e interprovincial (Tello, 2012).

3.1.6.4. Volúmenes aproximados de faenamiento

Se tiene un aproximado de 375 animales de ganado bovino y 120 de porcino que son sacrificados semanalmente. Mensualmente se tendría un aproximado de 1500 animales de ganado bovino y 480 de ganado porcino.

3.1.6.5. Impacto ambiental

Los residuos producto de las labores de faenamiento son eliminados de una manera irresponsable y esto afecta negativamente al medio ambiente. El olor puede ser el único problema importante de contaminación del aire. Es el resultado de las bacterias sobre la materia orgánica, además de las emisiones de gases de los procesos de incineración.

La contaminación del agua es uno de los principales problemas encontrados en esta área, debido a los volúmenes de líquidos con una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) producto de la cantidad de sólidos en suspensión, que en su mayoría están compuestos por grasa (Tello, 2012).

En el desposte de ganado (bovino, porcino), la sangre es uno de los desechos líquidos que más contribuye a contaminar el agua. Por ejemplo, sólo el 70% de la sangre del ganado es recuperable y utilizable para su posterior procesamiento. Otra fuente de aguas residuales se encuentra en el agua de lavado, en el corte de canales de ganado bovino.

La producción de los residuos orgánicos en el matadero puede afectar a la flora y la fauna debido a los cambios de pH que ocurren en el agua.

Las grasas son elementos de la contaminación del agua debido a su lenta degradación. Estos compuestos bloquean el paso de la luz a través del agua, retrasando así el crecimiento de algas.

Uno de los efectos de la presencia de sustancias orgánicas en los lugares donde no están presentes de forma natural es la proliferación de ratas, moscas, que pueden convertirse en un problema, ya que transmiten enfermedades.

Los suelos son generalmente más fértiles alrededor de los mataderos ya que las aguas residuales contienen nutrientes. Sin embargo, en San Mateo, Esmeraldas, este hecho no puede ser explotado debido a que el agua residual tiene un alto porcentaje de organismos patógenos.

Los trabajadores que realizan tareas como el lavado, pesado, masacre, pelado, corte, preparaciones intestinales, limpieza y preparación de las pieles, pueden adquirir enfermedades infecciosas como la brucelosis, la tuberculosis. También están expuestos a los parásitos como la Tenia. La descomposición de la materia orgánica también puede generar sulfuro de hidrógeno o amoníaco que tienden a irritar los ojos y la piel. Los cambios de temperatura y los gases liberados durante el proceso, causan la inflamación de las vías respiratorias, enfermedad gastrointestinal y renal (Tello, 2012).

3.1.6.6. Manejo de la bilis en el Camal Municipal de Esmeraldas

Se tiene un promedio de 220 ml de bilis por res de ganado vacuno, este valor no es constante ya que depende de diversos factores como es la edad, peso, reposo en corral del animal, estado del animal.

Se producen aproximadamente 2 tanques de 220 litros mensualmente, cada tanque es vendido en 50 dólares a una empresa quiteña quien se lleva la bilis para comercializarla hacia el exterior (Tello, 2012).

3.1.7. Camal de Antonio Ante

3.1.7.1. Lugar de investigación

- Provincia: Imbabura
- Cantón: Antonio Ante

3.1.7.2. Ubicación

Ubicado en la vía Panamericana Norte sector Catabamba, Parroquia Natabuela, fue construido hace 25 años.

3.1.7.3. Líneas de faenamiento

Se ofrece custodia de animales hasta el faenamiento, labores de faenamiento propiamente dichas, inspección sanitaria ante y post mortem en líneas de bovinos, ovinos y porcinos. También dispone de instalaciones para el lavado de las vísceras. La cuota que se paga a la Tesorería Municipal, es de \$ 10 por animal para ser sacrificado.

La infraestructura que posee está compuesta por: el área de aturdimiento para bovinos y porcinos, el área de desollado y evisceración. También hay un cuarto frío, un área para el lavado intestinal comestible y una zona dedicada a los establos que está fuera del matadero.

El matadero tiene una superficie de 17.110 m². El edificio tiene unos 580 m² con dos establos de 177 m² aproximadamente.

3.1.7.4. Impacto ambiental

Se generan una serie de residuos sólidos orgánicos que causan graves problemas ambientales al agua, suelo y aire, ya que no se gestionan adecuadamente. Los principales residuos son: el estiércol, el pelo, la grasa, trozos de carne, huesos y demás partes comestibles, son arrojados a la red de alcantarillado. Los materiales aptos para el consumo humano están entre el 20-50% del peso del animal (esto

depende del tipo de animal). La mayoría son residuos putrescibles y deben manejarse para evitar los olores y la propagación de la enfermedad. Todos estos desechos, pueden ser reutilizados para reducir la emisión de residuos sólidos.

3.1.7.5. Manejo de la bilis en el camal

No se dispone de información para el tratamiento de la bilis en el matadero. En la zona donde se vacían las entrañas de los animales hay una rampa que conduce las vísceras, tanto blancas y rojas. Las vísceras rojas se separan, se lavan y se transportan en bolsas de plástico, mientras que las blancas se cortan para liberar el contenido del rumen y, posteriormente, se lavan internamente y externamente.

3.1.8. Camal Municipal de Latacunga

Provincia: Cotopaxi

Cantón: Latacunga

3.1.8.1. Ubicación

Se encuentra ubicado en San Martín del Distrito, Parroquia Juan Montalvo.

3.1.8.2. Servicios que ofrece el camal

Ofrece todos los productos resultantes del sacrificio de los animales, incluidos los despojos, pieles y otros productos a sus propietarios.

El lugar no está equipado con cámaras frigoríficas para la conservación de la carne posterior al proceso de la masacre, por esta razón, sólo ofrece el servicio de desposte de ganado.

3.1.8.3. Impacto ambiental

En este aspecto no hay controles sobre las actividades llevadas a cabo en este lugar, tampoco se vigila la situación de los afluentes cercanos donde son arrojados los residuos sólidos y líquidos (ríos Yanayacu y Cutuchi).

3.1.9. Camal Municipal de Cayambe

Provincia: Pichincha

Cantón: Cayambe

3.1.9.1. Ubicación

Puerto Baquerizo vía S / N y Rocafuerte, seis calles de distancia del Hospital Raúl Maldonado Mejía).

3.1.9.2. Servicios que ofrece el camal

Sacrificio de ganado vacuno, ovino y porcino, zona de evisceración y lavado de intestinos.

3.1.9.3. Impacto ambiental

En el Camal Municipal de Cayambe se faenan 8 cabezas de ganado por día (la mayoría de los cuales son de origen bovino), las aguas residuales tienen un volumen promedio de 4.838,4 litros por día. En cuanto a los parámetros físico-químicos, la administración asegura que los residuos sólidos en suspensión están dentro de los límites permitidos por la ley.

Sin embargo, la gestión de los residuos no se realiza en el Camal Municipal de Cayambe, esto ha generado fuentes de contaminación para las personas que se encuentran en esa zona. Por tal motivo se está tratando de implementar mejoras en la gestión de residuos a través de la difusión de las normas correctas de eliminación.

3.1.9.4. Manejo de la bilis en el Camal Municipal de Cayambe

Actualmente no se recolecta la bilis de ganado vacuno y porcino, se la elimina sin ningún tratamiento previo con los demás desechos producto de las labores de faenamiento.

3.1.10. Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito, EMRAQ EP

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

3.1.10.1. Ubicación

Se encuentra ubicado en el sur de la ciudad de Quito, en la ciudadela La Ecuatoriana, calle Camilo Orejuela y Secundaria.

3.1.10.2. Servicio que ofrece el camal

La Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito, EMRAQ EP, es la instancia municipal encargada de operar el sistema municipal de faenamiento y comercialización de especies animales para el consumo humano en el Distrito Metropolitano de Quito; así como la infraestructura de camales municipales.

Los servicios que ofrece son:

- Faenamiento de bovinos
- Faenamiento de ovinos
- Faenamiento de porcinos
- Control veterinario ante - post mortem
- Inspección de carnes importadas
- Subproductos
- Alquiler de equipamiento

El Camal Metropolitano de Quito admite y brinda residencia de ganado vacuno, porcino y ovino, así como áreas de lavado y almacenamiento de desechos.

3.1.10.3. Manejo de la bilis en el Camal Metropolitano de Quito

Se obtienen 208 litros a la semana de bilis. La misma que se comercializa a un valor de \$ 130 los 55 galones. Y al mes se recolectan alrededor de 397 galones. Se recolectan de 400 a 500 g por cada año de cálculos biliares que se venden a un precio de 12 dólares por gramo a las empresas coreanas y colombianas. La venta de bilis y cálculos biliares crea un mercado de alrededor de \$ 10.000 por año.

3.1.10.4. Impacto ambiental

Uno de los mayores problemas, es el tratamiento de las aguas residuales debido a la gran cantidad de residuos que generan un olor acre y nauseabundo que favorece la proliferación de las moscas.

A nivel nacional, hay muchas falencias en cuanto a la utilización, transporte y el manejo del ganado. Otras dificultades se refieren a las instalaciones y equipos de sacrificio, así como a las condiciones sanitarias no adecuadas. El proceso de

faenamiento es muy heterogéneo en el Ecuador y el Camal Metropolitano de Quito cuenta con tecnología de punta.

El Camal Metropolitano de Quito ofrece el servicio de transporte de la carne y de los intestinos de acuerdo a la normativa vigente:

- Las leyes y reglamentos de la masacre
- Regulación de BPM (Buenas Prácticas de Manufactura);
- Decisión 197 (Ley 197) - Legislación subandina JUNAC;
- Código de salud;
- Interna regulaciones EMRQ.

Antes del sacrificio se realiza un control sanitario de los animales antes de ser sacrificados de acuerdo a las normas establecidas por el Ministerio de Agricultura del Ecuador. También lleva a cabo controles en las granjas. Siguen procedimientos, instrucciones y manuales que cumplan con los requisitos de salud en cada área y en cada sector. Cada día se comprueba la sanidad animal y control veterinario de los animales.

En el Camal Metropolitano de Quito lleva a cabo controles en otros camales que operan en el cantón de Quito, tanto para las estructuras rurales, como para las estructuras urbanas. Estos mataderos son:

- Carnol: se encuentra en la esquina noroeste de Calacalí, donde se fijará el nuevo camal, que será gestionado a nivel local, si es posible.
- Agroindustrias del Norte: situado en la zona de Llano Grande, también es supervisado por el sector privado del Camal Metropolitano de Quito.
- Camal Becerro: situado en la zona de Calderón, es un camal privado controlado por el Distrito Metropolitano.
- Camal Quinche: en el lado opuesto del valle de Tumbaco.
- Camal Pintag: en el lado opuesto del Camal de Quito, en el sur de la ciudad hacia el Valle de los Chillos.
- Camal Conocoto: controlado por el Distrito Metropolitano de Quito.

3.1.10.5 Tratamiento de residuos

Desde 2007, se tiene un biodigestor y por lo tanto es capaz de generar productos para la nutrición equilibrada de los animales y fertilizantes orgánicos para enriquecer los suelos. La capacidad de procesamiento es de 6.000 Litros de sangre por día, la misma que es obtenida en el proceso de sacrificio de las tres líneas de ganado: vacuno, porcino y ovino.

La harina se vende a los productores que utilizan como abono, también se utiliza para generar alimentos para mascotas. Cada día se producen alrededor de 1.200 kg.

3.1.11. Panorama general de los camales del Ecuador

3.1.11.1. Impacto Ambiental

Luego de realizar la investigación en los camales anteriormente mencionados se pudo evidenciar, que no se realiza un manejo eficiente de los desechos producto de las labores de faenamiento, los desechos líquidos como son: sangre, agua, orina, entre otros son eliminados directamente a los afluentes más cercanos; los desechos sólidos como son: estiércol, trozos de grasa, pelo, cascos, orejas, colas, cachos, huesos de cabezas y quijadas; son enviados a los rellenos sanitarios. Los únicos camales que utilizan algunos de los desechos para posteriores usos son: El Camal Metropolitano de Quito y el Camal Frigorífico de Riobamba que utilizan la sangre de ganado vacuno para la elaboración de harina de sangre utilizada como alimento para aves. Y tienen biodigestores que son utilizados para elaborar biofertilizantes para enriquecer los suelos.

3.1.11.1. Manejo de la bilis en los camales del Ecuador

La bilis es uno de los desechos generados en los camales, la cantidad de bilis en el ganado vacuno y porcino varía en función de las condiciones previas al faenamiento: alimentación o ayuno del animal, reposo, peso, edad, sexo; en la presente investigación se realizó muestreos para conocer la cantidad de bilis de ganado

vacuno obteniéndose un promedio de 250 ml y en caso de la bilis de ganado porcino se obtuvo un promedio de 30 ml.

La bilis en la mayoría de los camales es desechada en conjunto con los demás residuos, los camales que recolectan la bilis para venderla en crudo son: Camal Metropolitano de Quito, Camal Frigorífico de Riobamba, Camal Municipal de Ambato, Camal Municipal de Guayaquil. Estos camales la comercializan con un precio que va desde 50 hasta 300 dólares los tanques de 220 Litros a empresas que son las que posteriormente la procesan para venderla al extranjero.

3.1.11.2. Lugares idóneos para el muestreo de microorganismos con capacidad de biotransformación

Al realizar las visitas a los camales, como zonas idóneas para el muestreo para futuras investigaciones se establecieron los camales de: San Mateo (Esmeraldas) en donde no se realizan rigurosos controles y los factores ambientales como el clima favorecen el crecimiento de microorganismos que están en contacto con fluidos y partes del ganado.

Otro lugar idóneo para el muestreo es el Camal Municipal de Pedernales(Manabí), en donde de igual manera se tiene un alto grado de contaminación en las zonas en donde se realizan las labores de faenamiento y en lugares aledaños al camal, en donde son arrojados los desechos como : ríos, suelo, que podrían favorecer el crecimiento de microorganismos que crecen en diferentes condiciones que no se han investigado anteriormente y podrían ser capaces de biotransformar estructuras esteroides de una manera muy eficiente.

Sin descartar los demás camales mencionados anteriormente como: Quito, Ambato, Riobamba, Guayaquil, Antonio Ante, pero con menor relevancia ya que en estos lugares si se realizan controles de higiene, tanto en animales como en todas las zonas por las cuales se realizan el proceso de faenamiento.

3.2. Resultado del aislamiento de bacterias y hongos de los camales municipales de Latacunga y Cayambe

Tabla 5. Bacterias aisladas en el camal de Latacunga

Ciudad	Lugar de recolección	Designación de código
Latacunga	Canal de agua dentro de la planta	MM B1
Latacunga	Recipiente de recepción de los intestinos	MM B2
Latacunga	Área de almacenamiento de la piel	MM B3
Latacunga	Agua del canal interno	MM B4
Latacunga	Recipiente colector de las vesículas	MM B5
Latacunga	Mesa de recepción de los intestinos	MM B6
Latacunga	Área de procesamiento del animal	MM B7
Latacunga	Planta de agua externa	MM B8
Latacunga	Área de procesamiento del animal	MM B9
Latacunga	Área de recolección del intestino	MM B10
Latacunga	Mesa de recepción de los intestinos	MM B11
Latacunga	Recipiente que contiene el rumen	MM B12
Latacunga	Planta de agua externa	MM B13
Latacunga	Área de almacenamiento de la piel en el piso	MM B28
Latacunga	Recipiente colector de las vesículas	MM B41
Latacunga	Superficie de visceramiento	MM B60

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Tabla 6. Hongos aislados en el camal de Latacunga

Ciudad	Lugar de recolección	Designación de código
Latacunga	Mesa de recepción del intestino	MM F4
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F12
Latacunga	Agua del canal interno de procesamiento	MM F14
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F15
Latacunga	Contenedor del rumen	MM F16
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F18
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F19
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F21
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F22
Latacunga	Área de almacenamiento de la piel	MM F23
Latacunga	Contenedor rumen	MM F24
Latacunga	Contenedores de la vesícula biliar	MM F26
Latacunga	Contenedor rumen	MM F27
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F29
Latacunga	Superficie de la recepción del intestino	MM F30
Latacunga	Contenedor de vesículas biliares	MM F31
Latacunga	Contenedor de vesículas biliares	MM F33
Latacunga	Contenedor rumen	MM F34

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Tabla 7. Bacterias aisladas del camal de Cayambe. Sección 1

Ciudad	Lugar de recolección	Designación de código
Cayambe	Contenido del estómago de los animales	MM B14
Cayambe	Recipiente de recepción de los intestinos	MM B15
Cayambe	Recipiente de recepción de los intestinos	MM B16
Cayambe	Procesamiento del intestino	MM B23
Cayambe	Piso del área de recolección de las cabezas	MM B24
Cayambe	Paredes área de faenamiento	MM B25
Cayambe	Piso y paredes de destripamiento	MM B26
Cayambe	Procesamiento del intestino	MM B27
Cayambe	Paredes de la zona de sacrificio	MM B29
Cayambe	Piso de recolección de las ubres	MM B30
Cayambe	Piso y paredes del área de recolección de vísceras	MM B31
Cayambe	Paredes del área de recolección de vísceras	MM B32
Cayambe	Paredes de la zona de sacrificio	MM B33
Cayambe	Zona de recepción de las entrañas.	MM B34
Cayambe	Paredes de la zona de procesamiento del animal	MM B35
Cayambe	Contenedor intestinal situado en el matadero	MM B36
Cayambe	Piso y paredes del área de visceración	MM B37
Cayambe	Piso de lavado de vísceras	MM B38
Cayambe	Mesa de procesamiento de la entrañas	MM B39
Cayambe	Contenido del estómago de los animales en el estado de alimentación	MM B40
Cayambe	Piedra de lavado	MM B42
Cayambe	Paredes de la zona de procesamiento del animal	MM B43
Cayambe	Mesa de procesamiento de las entrañas	MM B44
Cayambe	Mesa de procesamiento de las entrañas	MM B45

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Tabla7. Bacterias aisladas del camal de Cayambe. Sección 2

Ciudad	Lugar de recolección	Designación de código
Cayambe	Superficie del procesamiento de los animales	MM B46
Cayambe	Zona de recepción de las entrañas	MM B47
Cayambe	Zona de recepción de las entrañas	MM B48
Cayambe	Zona de recolección de rumen	MM B50
Cayambe	Zona de recepción de las entrañas	MM B51
Cayambe	Zona de degollamiento de ganado	MM B52
Cayambe	Recipiente de recepción de los intestinos	MM B53
Cayambe	Paredes de la zona de sacrificio	MM B54
Cayambe	Paredes de la zona de procesamiento del animal	MM B55
Cayambe	Paredes laterales área de recolección de las vísceras	MM B56
Cayambe	Paredes de la zona de procesamiento del animal	MM B57
Cayambe	Zona de recepción de las vísceras	MM B59
Cayambe	Piso del área de desprendimiento de la piel	MM B61
Cayambe	Procesamiento del intestino	MM B62
Cayambe	Recipiente de recepción de los intestinos	MM B63
Cayambe	Recepción de las entrañas	MM B64
Cayambe	Paredes de la zona de procesamiento del animal	MM B65
Cayambe	Equipo de procesamiento de los animales	MM B66
Cayambe	Contenido del estómago de los animales en el estado de alimentación	MM B67
Cayambe	Entrañas de la zona de recepción	MM B68
Cayambe	Paredes área de faenamiento	MM B69
Cayambe	Piedra de lavar C	MM B70
Cayambe	Piso	MM B71
Cayambe	Paredes de los mataderos	MM B72
Cayambe	Mesa del contenido estomacal	MM B73
Cayambe	Baño	MM B74

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Tabla 8. Hongos aislados en el camal de Cayambe

Ciudad	Lugar de recolección	Designación de código
Cayambe	Paredes de la área de recolección de vísceras	MM F1
Cayambe	Paredes de la área de recolección de vísceras	MM F2
Cayambe	Entrada de cerdos	MM F3
Cayambe	Paredes de la zona de sacrificio	MM F5
Cayambe	Área externa del camal	MM F6
Cayambe	Zona de procesamiento del intestino	MM F7
Cayambe	Zona de procesamiento del intestino	MM F8
Cayambe	Zona de recepción de las entrañas	MM F9
Cayambe	Zona fuera del lugar de faenamiento	MM F10
Cayambe	Mesa de procesamiento de los intestinos	MM F11
Cayambe	Entrada de cerdos	MM F13
Cayambe	Área de corte de carne	MM F17
Cayambe	Paredes de la zona de sacrificio	MM F20
Cayambe	Recipiente colector de las vesículas	MM F25
Cayambe	Paredes de la zona de sacrificio	MM F28

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

3.3. Resultados de la biotransformación de la sal de ácido biliar colato de sodio por bacterias

(X) Biotransforma

(--) No biotransforma

(0) Utiliza todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.

Tabla 9. Resultado de biotransformación de colato de sodio por bacterias

Código	24 horas	48 horas	Código	24 horas	48 horas
MM B23	--	--	MM B46	--	X
MM B24	0	0	MM B47	--	--
MM B25	X	X	MM B48	--	X
MM B26	0	0	MM B50	--	--
MM B27	X	0	MM B51	--	--
MM B28	X	X	MM B52	0	0
MM B29	0	0	MM B53	--	--
MM B30	X	X	MM B54	X	0
MM B31	--	--	MM B55	--	X
MM B32	--	--	MM B56	0	0
MM B33	--	--	MM B57	--	--
MM B34	--	--	MM B58	--	--
MM B35	0	0	MM B59	--	X
MM B36	X	X	MM B60	--	--
MM B37	X	X	MM B61	--	--
MM B38	X	X	MM B62	--	--
MM B39	--	--	MM B63	--	--
MM B40	--	--	MM B64	--	--
MM B41	--	--	MM B65	--	X
MM B42	X	0	MM B66	X	X
MM B43	--	--	MM B67	--	--
MM B44	--	0	MM B68	X	X
MM B45	X	X	MM B69	X	X

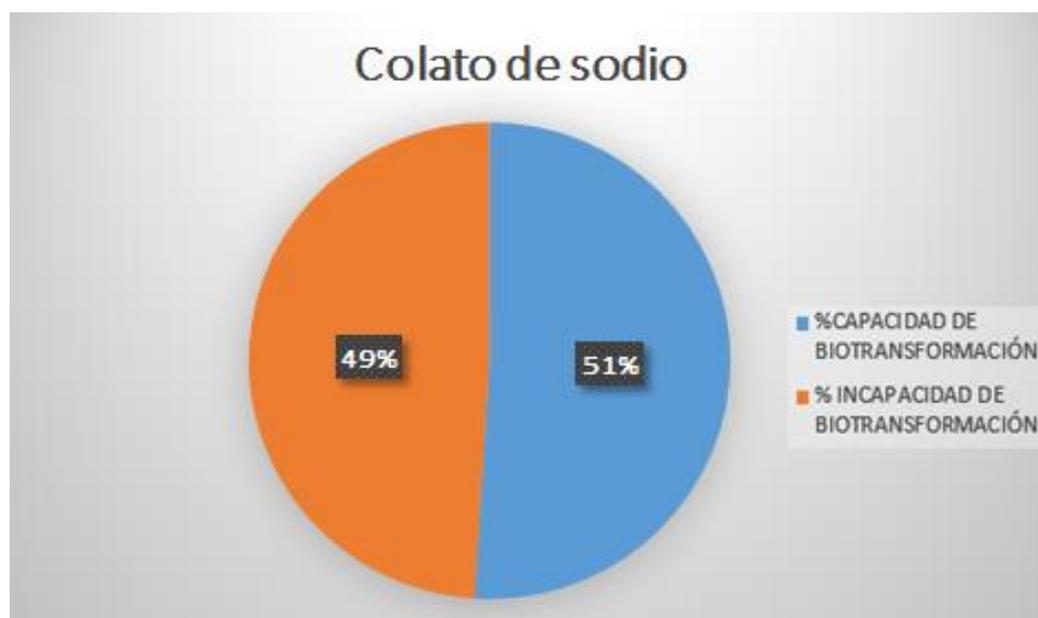
Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

De un total de 47 cepas bacterianas que se evaluaron, 24 realizan un proceso de biotransformación de estas, 10 cepas desaparecen la sal de ácido biliar colato de sodio por completo hasta consumirlo y formar CO₂.

Las bacterias más representativas dentro de la investigación presentan capacidad de biotransformación a las 24 y 48 horas, a partir de estos resultados se continuo con el escalamiento bacteriano para extraer los metabolitos de interés.

3.4. Capacidad de biotransformación e incapacidad de biotransformación de colato de sodio por bacterias.

Figura 15. Capacidad e incapacidad de biotransformación de colato de sodio por bacterias



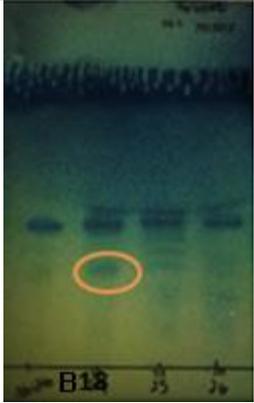
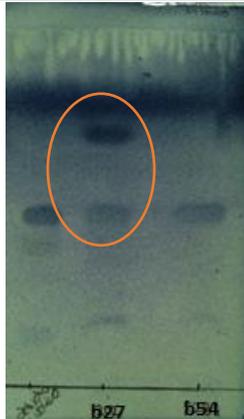
Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

De 47 bacterias evaluadas se obtiene que un 51% (24 bacterias) tienen capacidad de biotransformación y de estas 10 usan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono. Mientras que el 49% representa a las bacterias que no realizan ningún proceso de biotransformación.

3.5. Determinación de la capacidad de biotransformación del colato de sodio por bacterias.

Para determinar el porcentaje de la capacidad de biotransformación se hizo un análisis de las placas cromatográficas donde se pueden apreciar los metabolitos. Dependiendo de la intensidad de las manchas se siguieron los patrones que se detallan a continuación, en donde se puede observar cómo se realizó la selección.

Tabla 10. Rango de porcentajes de biotransformación

1) Rango de porcentaje de biotransformación desde 0-25% (MM B18)	2) Rango de porcentaje de biotransformación desde 25-50% (MM B37)	3) Rango de porcentaje de biotransformación desde 50-75% (MM B 27)	4) Rango de porcentaje de biotrasformación desde 75-100% (MM B24, MMB26)
			

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

- 1) 0-25%.- se puede apreciar una ligera mancha en la parte inferior de la bacteria MM B18, mientras que la mancha del estándar ubicada en la parte superior se encuentra intensa.

- 2) 25-50%.- se puede apreciar una mancha de mayor intensidad en la parte superior del estándar de la bacteria MM B37, que muestra la presencia de un metabolito en una mayor concentración.

- 3) 50-75%.- se puede apreciar una mancha de mayor intensidad en la parte superior del estándar de la bacteria MM B27. La mancha del estándar de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio va disminuyendo y va aumentando la intensidad de la mancha del metabolito que se encuentra en la parte superior.
- 4) 75-100%.- se puede apreciar como las manchas de los estándares han desaparecido en las bacterias MM B24 y MM B26, ya que la bacteria ha usado todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.

Tabla 11. Porcentaje de biotransformación de colato de sodio entre el 50-100% realizado por bacterias

Código bacteria	Tiempo	% de biotransformación	Código Bacteria	Tiempo	% de biotransformación
MM B25	48 horas	80%	MM B50	48 horas	100%
MM B26	48 horas	100%	MM B54	48 horas	75%
MM B30	48 horas	50%	MM B66	48 horas	80%
MM B35	48 horas	80%	MM B67	48 horas	80%
MM B36	48 horas	75%	MM B68	48 horas	70%
MM B38	48 horas	85%	MM B69	48 horas	80%
MM B44	48 horas	80%			

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Como se puede observar en la tabla 11, existen diferentes porcentajes de biotransformación de cada una de las bacterias, las de mayor importancia son las que tienen un porcentaje de biotransformación mayor al 50% estas son: MM B25, MM B26, MM B30, MM B35, MM B36, MM B38, MM B44, MM B50, MM B54, MM B66, MM B67, MM B68, MM B69.

Tabla 12. Rango de porcentaje de biotransformación de la sal de ácido biliar colato de sodio por bacterias

Nº de bacterias	Rango de porcentaje de biotransformación
3	50-75%
10	75-100%

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Las bacterias más representativas según su capacidad biotransformadora son las que se encuentran en el rango de 50-100% por presentar una alta capacidad de biotransformación, pudiendo encontrar a 13 bacterias dentro de este grupo.

3.6. Resultados de la biotransformación de colato de sodio por hongos

(X) Biotransforma

(--) No Biotransforma

(0) Utiliza todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.

Tabla 13. Resultados de la biotransformación de colato de sodio por hongos.

Código hongo	# horas de biotransformación	Código hongo	# horas de biotransformación
MM F11	--	MM F23	--
MM F12	--	MM F2	--
MM F13	--	MM F24	--
MM F14	--	MM F25	--
MM F15	--	MM F26	--
MM F16	--	MM F8	--
MM F17	--	MM F27	--
MM F18	--	MM F28	--
MM F19	--	MM F29	--
MM F20	--	MM F30	--
MM F6	--	MM F31	--
MM F4	--	MM F32	--
MM F21	--	MM F33	--
MM F22	--	MM F34	--

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

De un total de 30 hongos evaluados, ninguno de estos son capaces de biotransformar la sal de ácido biliar colato de sodio.

3.7. Escalamiento de bacterias de interés que biotransforman la sal de ácido biliar colato de sodio

MM B30 (anexo 3): Se escogió esta bacteria al presentar biotransformación a las 24 horas.

MM B42 (anexo 4): Se realizó el monitoreo de esta bacteria a las 24 horas. Se puede observar que a las 24 horas presenta biotransformación bien definida con una mancha arriba del estándar.

MM B25 (anexo 5): Se realizó el monitoreo de esta bacteria a las 24 horas, podemos observar que a las 24 horas presenta biotransformación sobre el estándar.

MM B37 (anexo 6): Se realizó el monitoreo de esta bacteria a las 24 y 48 horas, podemos observar que a las 24 horas presenta biotransformación sobre el estándar y a las 48 horas la mancha de biotransformación se presenta con más intensidad.

3.8. Resultado de identificación de las bacterias

Se escogieron 4 bacterias capaces de biotransformar la sal de ácido biliar colato de sodio que presentaban un porcentaje de biotransformación superior al 50%, a continuación se encuentran las bacterias identificadas.

Tabla 14. Identificación de las bacterias de mayor interés con capacidad para biotransformar la sal de ácido biliar colato de sodio

Código	Especie	Probabilidad (*)
MM B30	<i>Serratia marcescens</i>	94.31%
MM B42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95.37%
MM B25	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	86.04%
MM B37	<i>Pasteurella haemolytica</i>	100%

*probabilidad del 99%

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

- La bacteria MM B30 corresponde a *Serratia marcescens* con una probabilidad del 94.31%, esta bacteria es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo; perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Patiño, Rodríguez, Alarcon, & Abitbol, 2005).

- La bacteria MM B42 corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* con el 95.37% de aceptabilidad esta bacteria es un bacilo gramnegativo aerobio con un flagelo polar, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina (Tapia & Romero, 2006).

- La bacteria MM B 25 pertenece a *Yersinia pseudotuberculosis* Aunque se ha reportado como agente causal de enfermedad en humanos, es principalmente un patógeno de animales. En los cuyes la yersiniosis es una de las enfermedades que causan importantes pérdidas económicas debido a sus altos índices de morbi-mortalidad (Viboud & Bliska, 2005).

- La bacteria MM B37 corresponde a *Pasteurella haemolytica* con una probabilidad del 100% de aceptabilidad, es una Gram negativa, muy pequeña y con forma de cocobacilos. Este género de bacterias son inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, catalasa (+), oxidasa (+), capsulados, no esporulan, y son indol (+) (Post, Cole, & Raleigh, 1991).

3.9. Resultados de la biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por bacterias

(X) Biotransforma

(--) No Biotransforma

(0) Utiliza todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.

Tabla 15. Resultado de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por bacterias

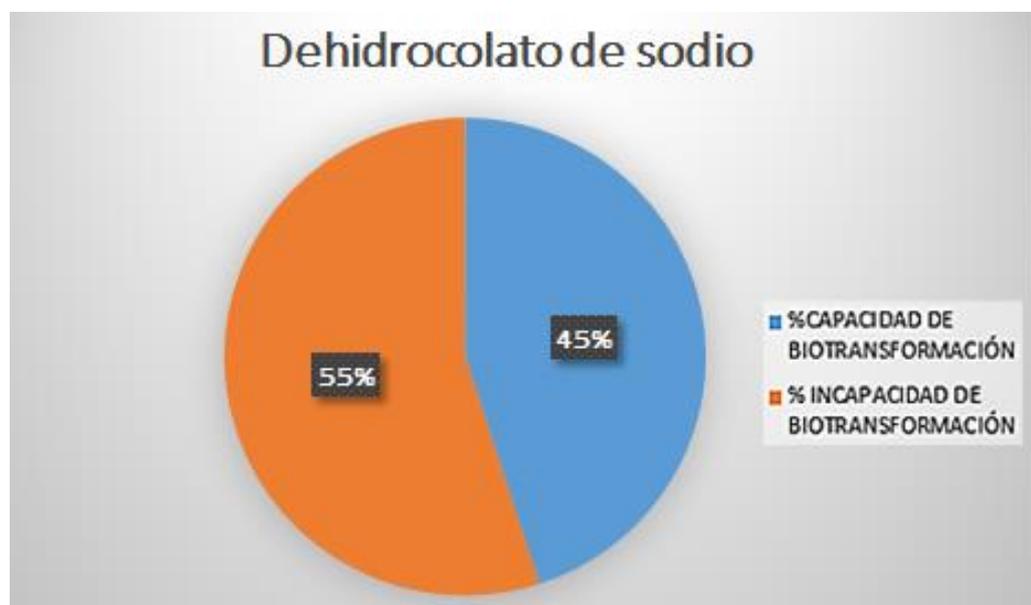
Código	24 horas	48 horas	Código	24 horas	48 horas
MM B23	--	--	MM B46	--	--
MM B24	0	0	MM B47	--	--
MM B25	--	--	MM B48	--	--
MM B26	0	0	MM B50	--	--
MM B27	X	X	MM B51	--	--
MM B28	--	--	MM B52	X	X
MM B29	X	X	MM B53	--	--
MM B30	X	--	MM B54	X	X
MM B31	--	--	MM B55	--	--
MM B32	--	--	MM B56	--	--
MM B33	--	--	MM B57	X	X
MM B34	--	--	MM B58	X	X
MM B35	X	X	MM B59	--	--
MM B36	--	--	MM B60	X	X
MM B37	X	X	MM B61	--	--
MM B38	X	0	MM B62	--	--
MM B39	X	--	MM B63	X	X
MM B40	0	0	MM B64	--	--
MM B41	--	--	MM B65	X	X
MM B42	--	--	MM B66	--	X
MM B43	--	--	MM B67	X	X
MM B44	0	0	MM B68	--	--
MM B45	X	X	MM B69	--	--

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

De un total de 47 cepas bacterianas evaluadas, 21 cepas realizan biotransformación de la sal de ácido biliar (dehidrocolato de sodio). De las 21 cepas que realizan biotransformación, 6 cepas desaparecen la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio,

porque utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.

Figura 16. Porcentaje de biotransformación de sal de ácido biliar (dehidrocolato de sodio) por bacterias



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Como se puede observar en la figura.16, existe un 45% de capacidad de biotransformación, representado por 21 cepas bacterianas, esto nos indica que existe un número considerable de cepas que realizan algún proceso biotransformativo que podrían ser de mucho interés en esta investigación. El 55% está representado por las bacterias que no realizan ningún proceso de biotransformación.

3.10. Determinación de la capacidad de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio

Para determinar el porcentaje de la capacidad de biotransformación se hizo un análisis de las placas cromatográficas en donde se pueden apreciar los metabolitos. Dependiendo de la intensidad de las manchas se siguieron los patrones que se encuentran en la tabla 10, en donde se puede observar cómo se realizó la selección.

Tabla 16. Porcentajes de biotransformación del dehidrocolato de sodio por bacterias

Código bacteria	Tiempo	% de biotransformación
MM B24	48 horas	100%
MM B26	48 horas	100%
MM B27	48 horas	80 %
MM B29	48 horas	55 %
MM B35	48 horas	95%
MM B37	48 horas	55%
MM B38	48 horas	100%
MM B40	48 horas	100%
MM B44	48 horas	100%
MM B45	48 horas	85%
MM B52	48 horas	100%
MM B54	48 horas	80%

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Como se puede observar en la tabla 16, se encuentran 12 bacterias que tienen un porcentaje comprendido entre el 50-100%, estas son consideradas como las de mayor interés, pues tienen un alto porcentaje de biotransformación de la sal de ácido biliar.

Tabla 17. Rango de porcentaje de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por bacterias

Nº de bacterias	Rango de porcentaje de biotransformación
2	50-75%
10	75-100%

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Las bacterias más representativas según su capacidad biotransformadora son las que se encuentran en el rango de 50-100% por presentar una alta capacidad de biotransformación, pudiendo encontrar 12 bacterias dentro de este grupo.

3.11. Resultados de la biotransformación de la sal de ácido biliar colato de sodio por hongos

(--) No biotransforma

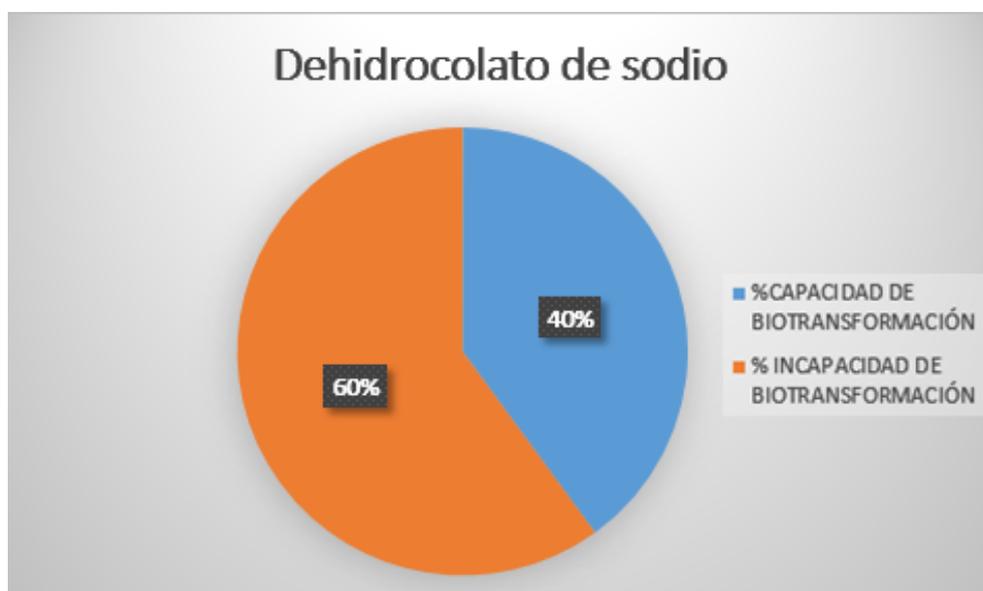
Tabla 18. Biotransformación de dehidrocolato de sodio por hongos

Código hongo	# horas de biotransformación	Código hongo	# horas de biotransformación
MM F11	72	MM F22	144
MM F12	72	MM F23	--
MM F13	--	MM F2	--
MM F14	144	MM F24	--
MM F15	24	MM F25	24
MM F16	96	MM F26	--
MM F17	120	MM F8	--
MM F18	144	MM F28	--
MM F19	48	MM F29	--
MM F20	--	MM F30	--
MM F6	144	MM F31	--
MM F4	--	MM F32	--
MM F21	144	MM F33	--

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

De un total de 30 cepas de hongos, se han encontrado 12 cepas que son de interés ya que realizan procesos de biotransformación. Las cepas son: MM F11, MM F12, MM F14, MM F15, MM F16, MM F17, MM F18, MM F9, MM F6, MM F21, MM F22, MM F24.

Figura 17. Porcentaje de biotransformación de sal de ácido biliar (dehidrocolato de sodio) por hongos



Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

Como se puede observar existe un 40% (12) que representa a los hongos que tienen la capacidad para biotransformar la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio. El 60% representa a los hongos que no realizan ningún proceso biotransformativo.

En la tabla 19 que se encuentra a continuación se pueden observar los porcentajes de biotransformación de los hongos, como ya se mencionó anteriormente esta clasificación se realizó en base a la observación de las placas de TLC, en donde dependiendo de la intensidad de las manchas que indicaban la presencia de metabolitos se estableció patrones que se encuentran como ejemplo en la tabla 10.

Como se puede evidenciar los hongos biotransformaron la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio en un porcentaje menor al 50% y en una mayor cantidad de tiempo hasta 144 horas, en comparación con las bacterias que demostraron ser más eficientes al realizar la biotransformación hasta en 48 horas.

Por tal motivo no se identificaron mediante morfología ni se realizó resonancia magnética nuclear para identificar metabolitos de interés.

Tabla 19. Porcentajes de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio por hongos

Código(hongo)	Tiempo	% de biotransformación
MM F11	144 horas	30%
MM F12	144 horas	30%
MM F14	144 horas	45%
MM F15	144 horas	30%
MM F16	144 horas	35%
MM F17	144 horas	25%
MM F18	144 horas	30%
MM F21	144 horas	45%
MM F22	144 horas	40%
MM F24	144 horas	25%
MM F6	144 horas	35%
MM F9	144 horas	25%

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

3.12. Escalamiento de bacterias de interés que biotransforman la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio

MM B26 (anexo 28): Se escogió esta bacteria por presentar biotransformación a las 24 y 48 horas, como se puede observar los productos de la biotransformación se encuentran en la parte inferior del estándar.

MM B35 (anexo 28): Se escogió la bacteria por presentar biotransformación a las 24 y 48 horas, los productos de interés se ubican en la parte inferior del estándar.

MM B37 (anexo 29): Se escogió esta bacteria por presentar biotransformación a las 24 y 48 horas, las manchas de interés se encuentran en la parte inferior del estándar. Las manchas se muestran más intensas a las 48 horas del monitoreo.

MM B54 (anexo 30): Se escogió esta bacteria por presentar biotransformación a 24 y 48 horas, como se puede observar los productos de la biotransformación se encuentran en la parte superior e inferior del estándar.

MM B27 (anexo 30): Se escogió esta bacteria por presentar biotransformación a las 24 y 48 horas .El metabolito se encuentra en la parte superior del estándar. La mancha no se muestra pronunciada.

3.13. Identificación de bacterias

Para la identificación de bacterias, primero se realizó tinción de Gram para determinar si las bacterias de interés eran Gram negativas o Gram positivas.

Luego de realizar la técnica se pudo determinar que todas las bacterias eran Gram negativas para lo cual se procedió a utilizar el sistema de identificación Microgen para identificar las bacterias con altos porcentajes de biotransformación.

Tabla 20. Identificación de las bacterias de mayor interés con capacidad para biotransformar la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio

Código	Nombre	Probabilidad (*)
MM B54	<i>Vibrio carchariae</i>	87.32%
MM B35	<i>Pasteurella multocida</i>	96.33%
MM B45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.65%
MM B27	<i>Vibrio damsela</i>	99.93%
MM B26	<i>Proteus penneri</i>	94.46%

*probabilidad del 99%

Elaborado por: Andrés Daza, Juan Pineda

- La bacteria MM B54 fue identificada como *Vibrio carchariae* con una probabilidad del 87,32%, es una bacteria Gram negativa pequeña, curvada (con forma de coma) y con un único flagelo polar (Yii, Yang, & Lee, 1997).

- La bacteria MM B35, fue identificada como *Pasteurella multocida* con una probabilidad del 96.33 %, es una Gram negativa, no móvil, cocobacilo perteneciente a la familia Pasteurellaceae (Kuhnert & Christensen, 2008).
- La bacteria MM B45, fue identificada como *Pseudomonas aureginosa* es una bacteria Gram-negativa, aeróbica. Además es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas (Itah & Essien, 2005)
- La bacteria MM B27, fue identificada como *Vibrio damsela* con una probabilidad del 99.93 %, es una bacteria Gram negativa que posee forma de bastón curvo (forma de coma puede causar infecciones transmitidas por los alimentos, por lo general asociados con el consumo de marisco crudo. Normalmente se encuentran en agua, es un anaerobio facultativo que da positivo para oxidasa y no forma esporas (Brenner, Hickman, Lee, Steigerwalt, Fanning, Hollis & Seidler, 1983).
- La bacteria MM B26, fue indentificada como *Proteus Penneri* con una probabilidad del 94.96%, es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio y anaerobio facultativos. Todos ellos, y debido a la producción de fenilalanina desaminasa, se caracterizan por su capacidad para desaminar la fenilalanina y trasformarla en ácido fenilpirúvico; también hidrolizan la tirosina, desdoblan en casi todos los casos la urea y son resistentes a la colistina (Cantón, Sánchez, Moreno, & Morosini, 2006).

CONCLUSIONES

- Luego de haber realizado el screening se pudo evidenciar que de un total de 47 cepas bacterianas, 21 (45%), realizan biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio.
- De un total de 21 cepas bacterianas que realizan biotransformación, 6 cepas desaparecen la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio, porque utilizan todo el carbono la misma como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.
- De las 21 bacterias que realizan biotransformación, 12 bacterias que tienen un porcentaje comprendido entre el 50-100%, estas son consideradas como las de mayor interés, pues tienen un alto porcentaje de biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio.
- Luego de haber realizado el screening se pudo identificar que de un total de 30 cepas de hongos, 12 (40%), realizaban biotransformación de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio. De estos todos biotransforman en un porcentaje menor al 50% por lo cual no resultan de interés en esta investigación y no se realizó la identificación de los mismos.
- Realizado el screening se pudo concluir que de un total de 47 cepas bacterianas, 24 cepas (51 %) tienen una capacidad de biotransformación de la sal de ácido biliar colato de sodio.
- De las 24 cepas que biotransforman 10 bacterias utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar colato de sodio, como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.
- De un total de 30 hongos, ninguno de estos tuvo la capacidad de biotransformar la sal de ácido biliar colato de sodio.
- En el presente trabajo de investigación, se observó que las bacterias presentan un mayor porcentaje de biotransformación en relación a los hongos, debido a la diferencia de las rutas metabólicas que existen entre estos microorganismos. Además las bacterias realizan la biotransformación en menor tiempo aproximadamente 48 horas en comparación a los hongos que realizan la biotransformación hasta en 144 horas.

- Se realizó una selección de las cepas bacterianas que tenían un alto porcentaje de biotransformación y presentaban metabolitos en la parte superior e inferior del estándar de las sales de ácidos biliares, para posteriormente identificarlas mediante el sistema Microgen, en el caso de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio se lograron identificar las siguientes bacterias, que son capaces de biotransformar esta sal con un alto rendimiento: MM B54: *Vibrio carchariae*, MM B38: *Pasteurella multocida*, MM B45: *Pseudomonas aureginosa* MM B27: *Vibrio damsela*. En el caso del sal de ácido biliar colato de sodio se lograron identificar las siguientes bacterias: MM B30: *Serratia marcencens*, MM B42: *Pseudomonas aeruginosa*, MM B25: *Yersinia pseudotuberculosis*, MM B37: *Pasteurella haemolytica*. MM B26: *Proteus penneri*. En ninguna de estas bacterias se reportan publicaciones relacionadas en el campo de la biotransformación de ácidos biliares, por lo que, éste sería el primer trabajo de investigación en el que se reporta esta actividad.
- Al realizar resonancia magnética nuclear se obtuvieron mezclas de compuestos, por lo que no fue posible identificar una molécula completa, sin embargo, se logró identificar un pequeño cambio en la estructura del anillo esteroidal realizado por la bacteria MM B35. Específicamente se produjo un doble enlace y una reducción en el C4.
- Los camales del Ecuador no están sujetos a normas de higiene rigurosas, ofrecen el servicio simple de faenamiento de reses, pero no se realizan controles de calidad, la elección de muestreo de microorganismos en el interior de estos lugares aumenta la capacidad de aislar cepas adaptadas a un entorno fuertemente " contaminado " y por lo tanto potencialmente más eficiente en la capacidad biotrasformativa de los propios ácidos biliares.
- El Camal Municipal de Riobamba utiliza los desechos producto de los labores de faenamiento, para la elaboración de productos como harina de sangre, reduciendo de esta forma la contaminación ambiental y generando nuevos productos.
- Actualmente en los camales del Ecuador solo se está comercializando la bilis de ganado vacuno, la bilis de ganado porcino y ovino es desechada sin realizar un tratamiento previo.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de bacterias para la biotransformación de sales de ácidos biliares por demostrar una mejor eficiencia en tiempo y en porcentaje de biotransformación en relación a los hongos.
- Se recomienda utilizar la bacteria MM B35 identificada como *Pasteurella multocida* para realizar una reducción en el C4 de la estructura de la sal de ácido biliar dehidrocolato de sodio para posibles aplicaciones en la industria farmacéutica, química, biotecnológica.
- En caso de que se identifiquen microorganismos que tengan la capacidad de biotransformar la sales de ácidos biliares (colato y dehidrocolato de sodio), que sean patógenos, se sugiere implementar técnicas de biología molecular para eliminar su patogenicidad.
- En el caso de las cepas bacterianas que desaparecen las sales de ácidos biliares y los productos de biotransformación, se recomienda continuar con la investigación por el eficiente sistema enzimático que poseen, que puede ser de interés biotecnológico.
- Luego de realizar la evaluación de la capacidad de biotransformación de los microorganismos mediante cromatografía en capa fina, es importante el uso de la RMN, ya que permite identificar componentes diversos que pueden provenir de la biotransformación del medio de cultivo y no de la sal de ácido biliar, de ahí la importancia de utilizar medios básicos, con los componentes mínimos para el crecimiento de los microorganismos.
- Se sugiere continuar con los estudios concernientes a la purificación de las enzimas, que son las que realizan la biotransformación. Una de ellas puede ser la que tenga la capacidad de obtener el ácido ursodesoxicólico.
- Se recomienda continuar la investigación en otras matrices como ríos contaminados o suelo, debido a que pueden contener microorganismos que sean de interés farmacológico.
- Se recomienda mantener y crear nuevas alianzas que permitan brindar las tecnologías y técnicas necesarias para realizar futuras investigaciones más especializadas y complejas dentro del campo de la biotransformación, fomentando así mayores avances en este campo de la ciencia.

LISTA DE REFERENCIAS

- Ahmad, S., Garg, S., & Johri, B. (1992). Biotransformation of sterols. *Biotechnology advances*, 10, 1-67. Recuperado el 20 de septiembre de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Aragozzini, F., Canzi, E., Ferrari, A., Maconi, E., & Sidjimov, A. (1985). A study on the mechanism of the epimerization at C-3 of cheuodeoxycholic acid by *Clostridium perfringens*. *Journal Biochemistry*, 230, 451-455. Recuperado el 11 de diciembre de 2013
- Bardy, E., & Koutinas, A. (1994). Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low temperature wine-making. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 42, 221-226. Recuperado el 12 de diciembre de 2013, de <http://pubs.acs.org>
- Barnes, S., & Kirk, D. (1988). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile acids. (P. Nair, D. Kritchevsky, & K. Setchell, Edits.) *num Press*, 65-136. Recuperado el 6 de enero de 2014, de <http://pubs.acs.org>
- Bartolini, O., Medici, A., & Poli, S. (1997). Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *The steroids*, 62, 564. Recuperado el 14 de noviembre de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- BD. (Febrero de 2009). *Difco TM*. Recuperado el 18 de diciembre de 2013, de <http://www.bd.com>
- Bensky, D., Gamble, A., & Kaptchuck, T. (24 de Marzo de 2011). *Asian Bear Bile Remedies: Traditional Medicine or Barbarism*. Recuperado el 12 de diciembre de 2013, de <http://www.sciencebasedmedicine.org>
- Brenner, D., Hickman, F., Lee, J., Steigerwalt, A., Fanning, G., Hollis, D., . . . Seidler, R. (1983). *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. *Journal Clinic Microbiology*, 18, 816-824. Recuperado el 3 de diciembre de 2013, de <http://jcm.asm.org>

- Cantón, R., Sánchez, M., Moreno, V., & Morosini, M. (Ocubre de 2006). Enfermedades infecciosa y microbiología clínica. *Proteus penneri*. *Elsevier*, 24, 8-13. doi:10.1016/S0210-5705(09)71003-9
- Carey, M., & Small, D. (1972). Bile Acid. *JAMA Internal Medicine*, 130, 506-527. Recuperado el 2 de noviembre de 2013, de <https://archinte.jamanetwork.com>
- Carvalho, C., & Fonseca, M. (2006). Biotransformation of terpenes. *Biothecnology advances-Elsevier*, 24, 134-142. Recuperado el 6 de noviembre de 2013, de <http://www.journals.elsevier.com>
- Casquete, W. (8 de Septiembre de 2012). Camal Municipal de Guayaquil. (A. Daza, Entrevistador) Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- Cevallos, J. (8 de Septiembre de 2012). Camal Municipal de Guayaquil. (A. Daza, Entrevistador) Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- Chacón, A. (6 de Septiembre de 2012). Camal Municipal de Riobamba. (A. Daza, Entrevistador) Riobamba, Tungurahua, Ecuador.
- Chavez, L. (28 de Agosto de 2012). Camal Municipal de Pedernales. (A. Daza, Entrevistador) Pedernales, Manabí, Ecuador.
- Chiang, J. (October de 2009). Bile acids:regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955-1966. Recuperado el 26 de Octubre de 2013, de <http://www.jlr.org>
- Chinaglia, N., Dean, M., Giovannini, P., Medici, A., Pedrini, P., & Poli, S. (1999). Regiospecific Oxidoreductions Catalyzed by a New Pseudomonas paucimobilis Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Tetrahedron*, 55, 1391. Recuperado el 11 de diciembre de 2013
- Cowen, A., Korman, M., Hofman, A., Cass, O., & Coffin, S. (1975). Metabolism of lithocholate in healthy man. *Gastroenterology*, 69, 67-76. Recuperado el 30 de agosto de 2013
- Dietschy, J., & Moore, E. (1964). Difference potentials and potassium distribution across the gallbladder wall. *Journal clinic investigation*, 43, 1551-1560. Recuperado el 30 de mayo de 2013

- Douglas, A., Skoog, Stanley, R., Crouch, F., & James, H. (2008). *Principios de análisis instrumental*. (C. L. American, Ed., & M. Anzures, Trad.) Michigan: Interamericana. Recuperado el 9 de enero de 2014
- Falla, H. (2009). Modelo de Manual de un Sistema Estándar de Procedimientos Sanitarios Operacionales (SSOP) para centros de faenamiento de ganado porcino y bovino. *Manual Procanor*, (págs. 22-45). Ibarra. Recuperado el 30 de enero de 2013
- Fedorowski, T., Salen, G., Tint, G., & Mosbach, E. (1979). Transformation of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid by human intestinal bacteria. *Gastroenterology*, *77*, 1068-1073. Recuperado el 9 de diciembre de 2013
- Fieser, L., & Rajagopalan, S. (1950). Ursodeoxycholic acid synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 5530-5536. Recuperado el 10 de octubre de 2013
- Flores, R. (2009). Informe de la cadena agroalimentaria de la carne. *FAO* (págs. 15-27). Quito: Acribia. Recuperado el 20 de diciembre de 2013
- Flórez, J., & Amado, J. (1997). *Estructuras esteroideas*. Recuperado el 15 de octubre de 2013, de <http://www.hvil.sld.cu>
- Fransen, N., & Walton, J. (1999). Chemical from plants. *World Scientific Publishers*, 277-235. Recuperado el 13 de diciembre de 2013, de <http://www.linkedin.com>
- Friedman, G., Raviola, C., & Fireman, B. (1989). Prognosis of gallstones with mild or no symptoms: 25 years of follow-up in health maintenance organization. *Journal Clinic Epidemiology*, *42*, 127-136. Recuperado el 22 de noviembre de 2013
- García, J., Uhía, I., & Galan, B. (noviembre de 2012). Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microbial Biotechnology*, *V*, 679-699. Recuperado el 12 de agosto de 2013, de <http://www.onlinelibrary.wiley.com>

- Gutiérrez, A. (2005). Litiasis vesicular diagnosticada ecográficamente en pacientes con dolor abdominal. *Revista ciencias*, 30-42. Recuperado el 2 de noviembre de 2013, de <http://www.revistaciencias.com>
- Habib, F. A. (2001). Role of laparoscopic cholecystectomy in the management of gangrenous cholecistitis. *American Journal Surgery*, 71, 181. Recuperado el 4 de noviembre de 2013
- Hardison, W., & Proffit, J. (1977). Influence of hepatic taurine concentration on bile acid conjugation with taurine. *American Journal of Physiology*, 758-763. Recuperado el 7 de agosto de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Haslewood, G. (1967). Ácidos biliares. *Journal Lipid Research*, 8(6), 535. Recuperado el 12 de septiembre de 2013, de <https://www.dspace.usc.es>
- Hill, M., & Drasar, B. (1968). Degradation of bile salts by human. *Gut*, 22-27. Recuperado el 13 de diciembre de 2013
- Hofman. (1976). The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Adv internal Med*, 501-534. Recuperado el 9 de septiembre de 2013
- Hofman, A. (1963). Chemical synthesis of Ursodeoxycholic Acid. *Acta Chemica Scandinavica*, (págs. 17-20). Recuperado el 9 de noviembre de 2013
- Hofmann, A. (1989). the enterohepatic circulation of bile acids. *Md American Physiological Society*, 567-596. Recuperado el 11 de septiembre de 2013, de <http://www.comprehensivephysiology.com>
- Howell, J., Lucy, J., Pirola, R., & Bouchier, A. (1970). Macromolecular assemblies of lipid in bile. *South eastern gastroenterology*, 1-6. Recuperado el 26 de septiembre de 2013, de <http://www.segsydney.com>
- Itah, A., & Essien, J. (2005). Growth Profile and Hydrocarbonoclastic Potential of Microorganisms Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny, Nigeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(7), 1317-1322. doi:10.1007/s11274-004-6694-z
- IUPAC. (1989). *The International Union of Pure and Applied Chemistry*. Recuperado el 11 de noviembre de 2013, de The Nomenclature of Steroids: <http://www.chem.qmul.ac.uk>

- Jaeger, K., & Eggert, T. (2004). Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *PubMed*, 15(4), 305-313. Recuperado el 12 de noviembre de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Kowdley, K. (2000). Gastroenterology. *American Journal of Medicine*, 481-486. Recuperado el 18 de noviembre de 2013, de <http://www.amjmed.com>
- Kuhnert, P., & Christensen, H. (2008). Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects. *Caister Academic Press*, 2-20. Recuperado el 9 de diciembre de 2013, de <http://books.google.com.ec>
- Kumar, D., & Tandon, R. (2001). Patologías de las vías biliares. *Journal Gastroenterology Hepatology*, 3-14. Recuperado el 8 de octubre de 2013, de <http://books.google.com.ec>
- Lasser, E. (2002). *Esteroides Topicos*. Recuperado el 10 de noviembre de 2013, de <http://www.cilad.org>
- Lezoche, E. (2000). Technical considerations and laparoscopic bile duct exploration: transcystic and choledochotomy. En Lezoche, *Semin Laparoscopic Surgery* (Vol. 7, pág. 262). Recuperado el 23 de noviembre de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Lippincott, W., & Wilkins. (2007). *Marks' essential medical biochemistry*. Hagerstwon. Recuperado el 27 de diciembre de 2013, de <http://www.abebooks.co.uk>
- MAGAP. (2009). Panorama de la Cadena Agroindustrial de la Carne y Subproductos. Quito. Recuperado el 7 de agosto de 2012, de <http://www.sica.gov.ec>
- Maitra, U., Mukhopadhyay, S., Sarkar, A., Rao, P., & Indi, S. (2001). supramolecular chemistry. *Angewandte Chemie*, 40(2), 2281-2283. Recuperado el 30 de junio de 2013, de <https://minerva.usc.es>
- Maldonado, M. (2013). *Biotransformación de Acidos Biliares*. Universidad de Ferrara, Ferrara. Recuperado el 7 de diciembre de 2013
- Medici, A., Bartolini, O. A., & Poli, S. (1997). Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Elsevier*, 62, 564-577. Recuperado el 9 de Septiembre de 2013

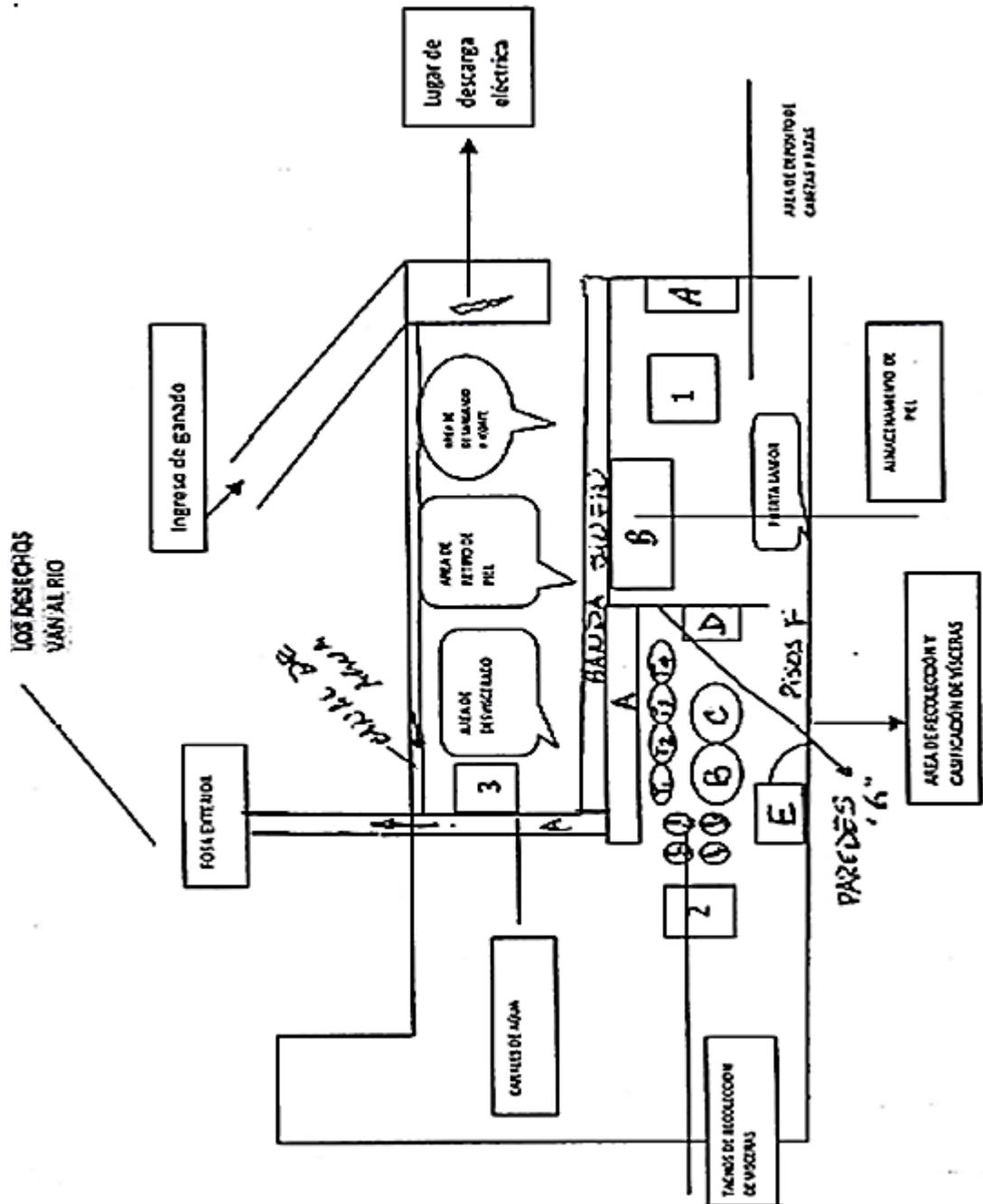
- Microgen Bioproducts Ltd. (26 de Diciembre de 2004). *Microgen*. Recuperado el 15 de Octubre de 2013, de <http://www.microgenbioproducts.com>
- Mukhopadhyay, S., Maitra, U., Ira, D., krishnamoorthy, G., Schmidt, J., & Talmon, Y. (2004). *Journal American Chemical*, 126(48), 15905-15910. Recuperado el 31 de Junio de 2013, de <http://pubs.acs.org>
- Nair, P., & Kritchevsky, D. (1971). *The bile acids. Chemistry, Phisiology and Metabolism*. (Vol. I). New York: Plenum Press. Recuperado el 22 de octubre de 2013, de <http://books.google.com.ec>
- Neogen Corporation. (Noviembre de 2010). *Neogen*. Recuperado el 17 de febrero de 2014, de <http://www.neogen.com>
- Ortiz, A. (6 de Septiembre de 2012). Camal Municipal de Ambato. (A. Daza, Entrevistador) Ambato, Tungurahua, Ecuador.
- Patiño, S., Rodríguez, N., Alarcon, T., & Abitbol, M. (julio de 2005). INFECCION POR SERRATIA MARCESCENS: CASO CLINICO. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*(147), 16-18. Recuperado el 25 de diciembre de 2013, de <http://listas.med.unne.edu.ar>
- Pedrini, P., Medici, A., & Bianchini, E. (1999). Acidi Biliari 2000, Aggiornamento Per Il Futuro. *Biotrasformazioni di acidi biliari, Una strategia complementare alla sintesi chimica* (pág. 189). Milano: Masson. Recuperado el 31 de noviembre de 2013
- Post, K., Cole, N., & Raleigh, R. (April de 1991). In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Pasteurella Haemolytica and Pasteurella Multocida Recovered from Cattle with Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3(2), 124-126. Recuperado el 4 de enero de 2014, de <http://vdi.sagepub.com>
- Puy, L., & Arévalo, M. (2008). Resonancia magnética nuclear (NMR). *Encuentro complutense para la divulgación en física nuclear y de partículas*, (pág. 10). España. Recuperado el 16 de enero de 2014

- Ransohoff, D., Gracie, W., & Wolfenson, L. (1983). Prophylactic cholecystectomy expectant management. *Annals of Internal Medicine*, 199-204. Recuperado el 23 de noviembre de 2013, de <http://www.annals.org>
- Sawada, H., Kinoshita, S., & Taguchi, H. (1981). Production of chenodeoxycholic acid by bioconversion of dehydrocholic. *Biothechnology advances*, 3, 495-500. Recuperado el 22 de diciembre de 2013
- Sergio, R., Roberto, B., Piero, P., & Giacomo, C. (11 de Diciembre de 1986). Preparative-Scale Regio- and Stereospecific Oxidoreduction of Cholic Acid. (I. d. Ormoni, Ed.) *Journal Organic Chemical*, 51, 2902-2906. Recuperado el 17 de Diciembre de 2013, de <http://pubs.acs.org>
- Steck, W., & Constabel, F. (1974). Microbiology. *PubMed*, 37, 185-191. Recuperado el 20 de diciembre de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Sun, L., & Fa, Y. (1995). Screening of strains producing ursodeoxycholic. *Weishengwu Xuebao*, 35, 197-203. Recuperado el 25 de diciembre de 2013
- Tapia, C., & Romero, C. (15 de Junio de 2006). *Microbios en linea*. Recuperado el 6 de febrero de 2014, de <http://pseudomonaaeruginosa.blogspot.com>
- Tello, J. (5 de Noviembre de 2012). Camal Municipal San Mateo. (A. Daza, Entrevistador) Esmeraldas, Esmeraldas, Ecuador.
- Trotman, B., Ostrow, J., & Soloway, R. (1974). Pigment vs cholesterol cholelithiasis: comparison of stone and bile composition. *American Journal of Digestive Diseases*, 585-590. Recuperado el 10 de noviembre de 2013, de <http://www.link.springer.com>
- Vázquez, E. (4 de Octubre de 2003). *Bioquímica y Biología molecular en linea*. Recuperado el 11 de septiembre de 2013, de <http://laguna.fmedic.unam.mx>
- Viboud, G., & Bliska, J. (22 de April de 2005). Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 59, 8-14. Recuperado el 22 de diciembre de 2013, de <http://www.annualreviews.org>

- Vlahcevic, Z., Heuman, D., & Hylemon, P. (1991). Regulation of bile acid synthesis. *Hepatology*, 13590-13600. Recuperado el 28 de Agosto de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Yii, K., Yang, T., & Lee, K. (1997). Aislamiento y caracterización de *Vibrio carchariae*, un agente causante de la gastroenteritis en los meros, *Epinephelus coioides*. *PubMed*, 109-115. Recuperado el 13 de diciembre de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Yousef, I., Barnwell, S., Touchwebwe, B., Weber, A., & Roy, C. (7 de June de 1987). Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation in rats. *PubMed*, 535-542. Recuperado el 16 de octubre de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3570165>
- Yuzhuo, L. (2008). Microelectronic applications of chemical mechanical planarization. *Wiley-Interscience*, 734. Recuperado el 29 de septiembre de 2013, de <http://www.wiley.com>

ANEXOS

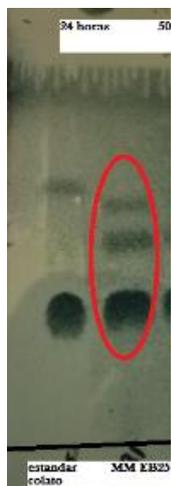
Anexo 1. Diagrama del camal Municipal de Latacunga.



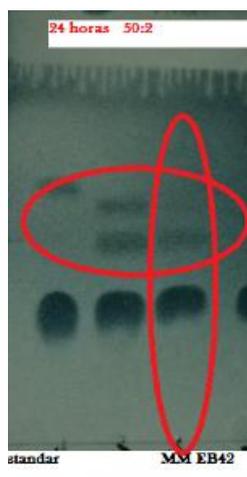
Anexo 3. TLC bacteria MM B30, lectura a las 24 horas, ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.



Anexo 4. TLC bacteria MM B25, lectura a las 24 horas, ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.



Anexo 5. TLC bacteria MM B42, lectura a las 24 horas ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.



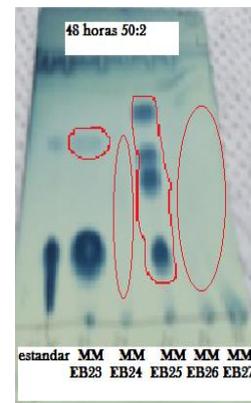
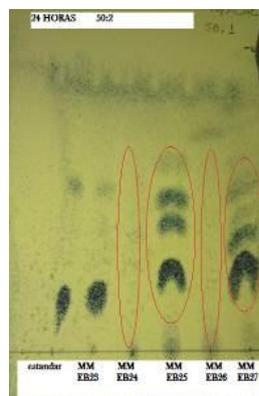
Anexo 6. TLC bacteria MM B37, esta comenzó a las 24 horas la biotransformación con el Ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.



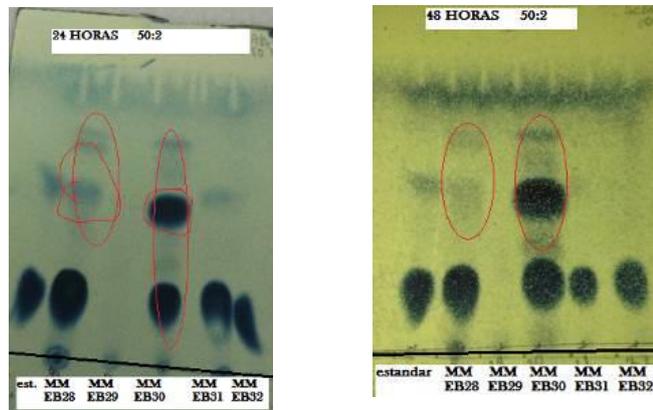
Anexo 7. TLC bacteria MM B37, biotransformación a las 48 horas con el ácido cólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.



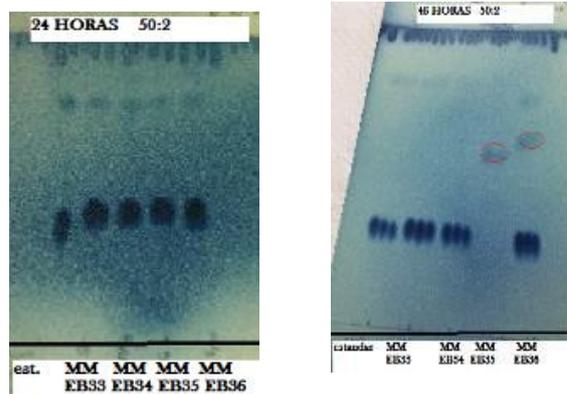
Anexo 8. TLC bacteria MM B23, MM B24, MM B25, MM B26, MM B27 biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



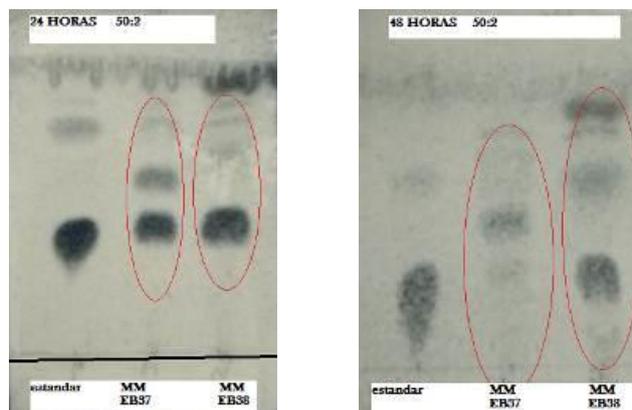
Anexo 9. TLC bacteria MM EB28, MM EB29, MM EB30, MM EB31, MM EB32, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



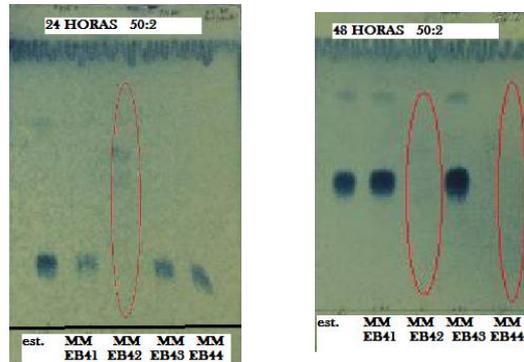
Anexo 10. TLC bacteria MM EB33, MM EB34, MM EB35, MM EB36, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



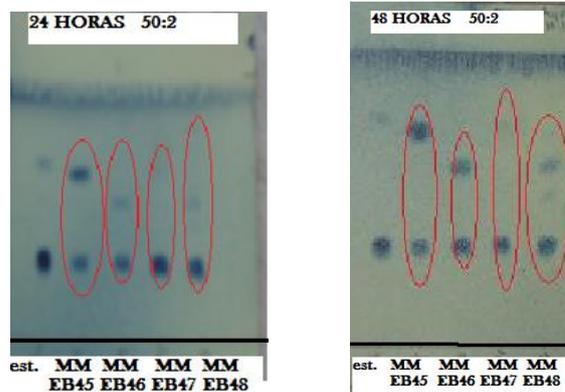
Anexo 11. TLC bacteria MM B37, MM B38, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



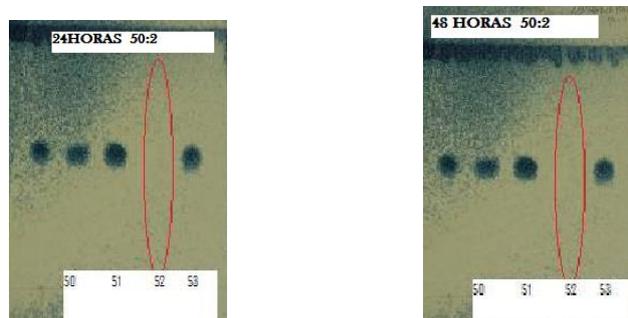
Anexo 12. TLC bacteria MM B41,MM B42, MM B43, MM B44, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



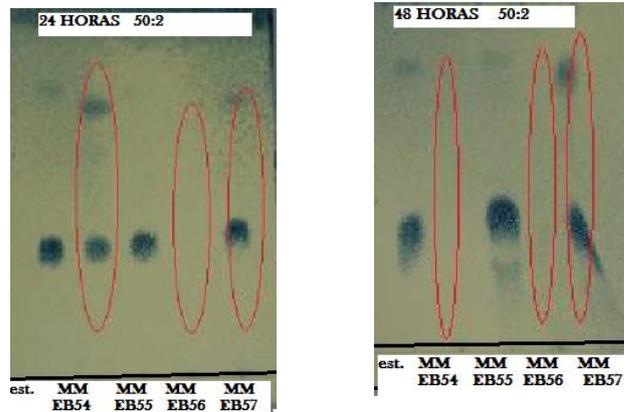
Anexo 13. TLC bacteria MM B45,MM B46, MM B47, MM B48, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



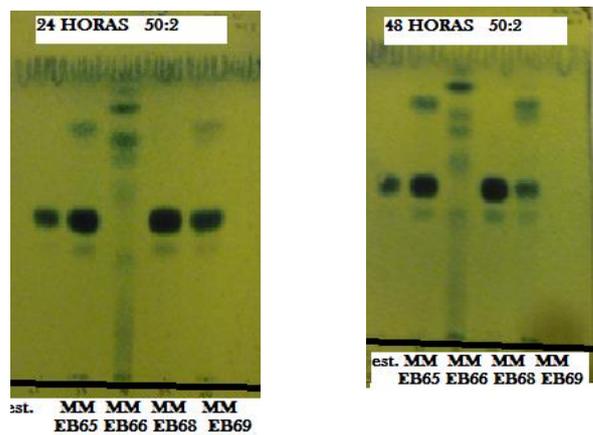
Anexo 14. TLC bacteria MM B50,MM B51, MM B52, MM B53, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



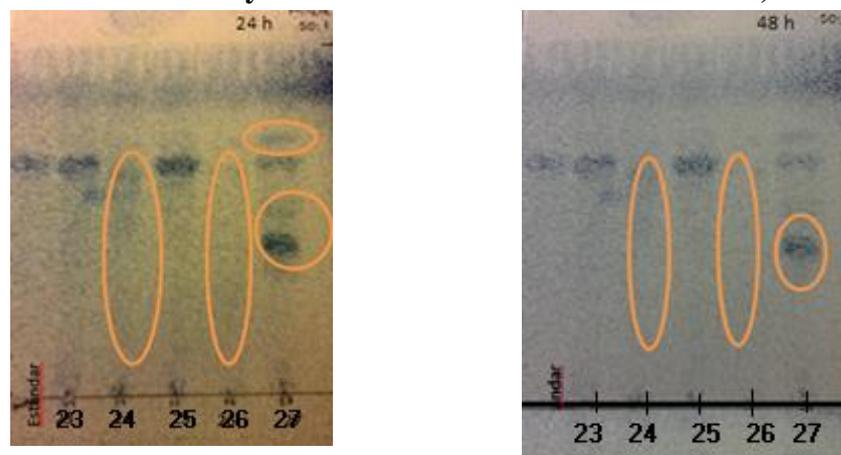
Anexo 15. TLC bacteria MM B54,MM B55, MM B56, MM B57, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



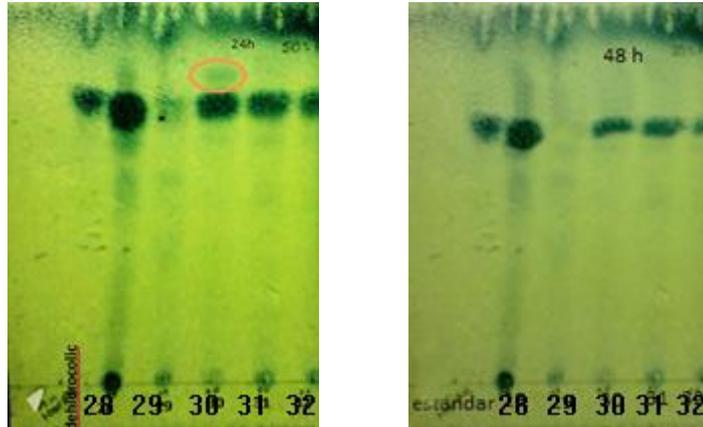
Anexo 16. TLC bacteria MM B54,MM B55, MM B56, MM B57, biotransformación a las 24 y 48 horas con el ácido cólico, fase móvil 1.



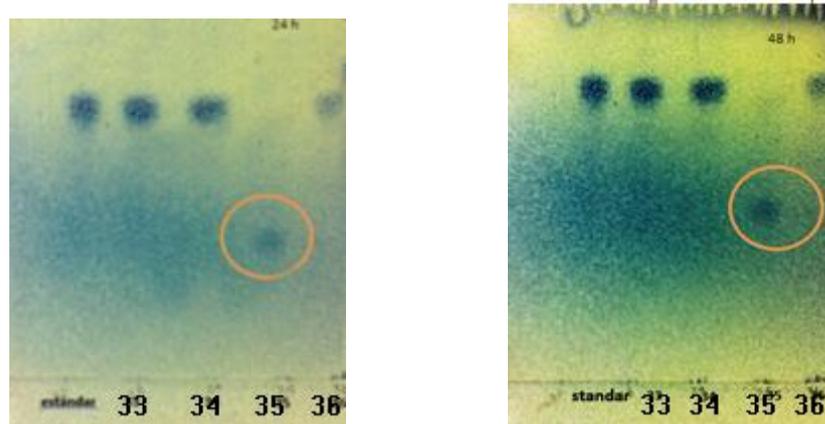
Anexo 17. TLC bacteria MM B23 ,MM B24, MM B26, MM B27, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 1.



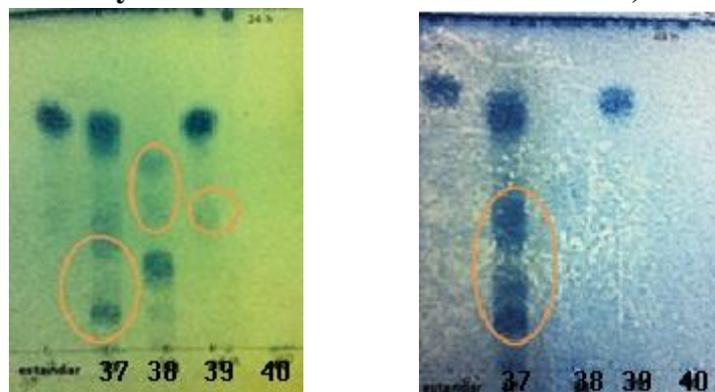
Anexo 18. TLC bacteria MM B29 ,MM B30, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 1.



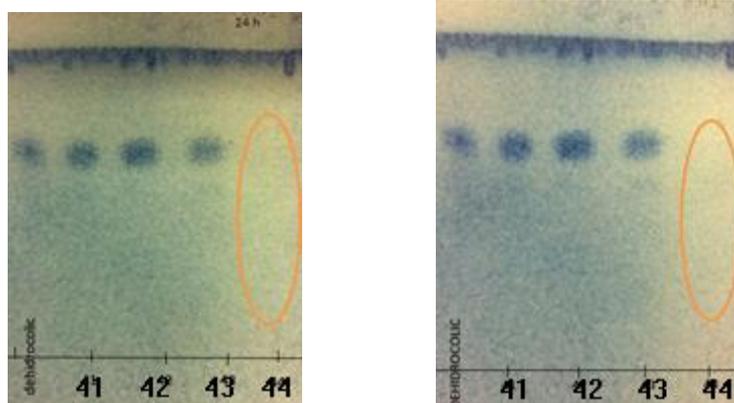
Anexo 19. TLC bacteria MM B35, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 1.



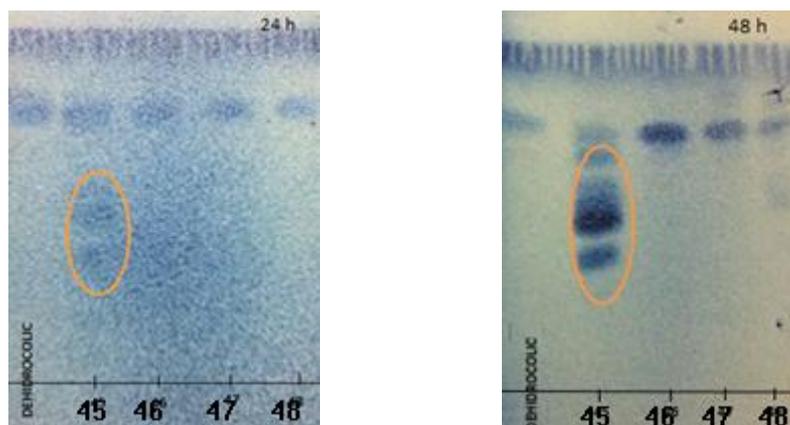
Anexo 20. TLC bacteria MM B37 ,MM B38,MM B39,MM B40 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.



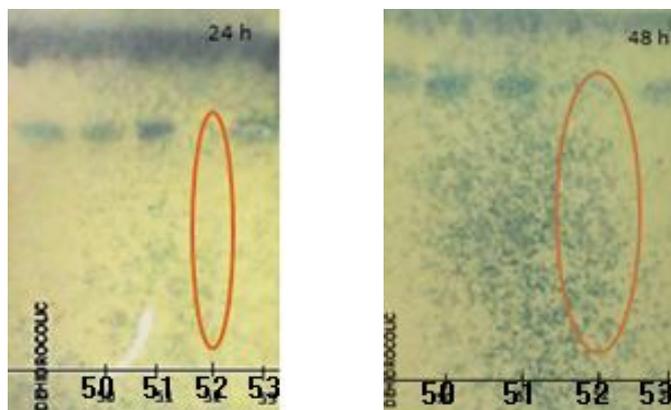
Anexo 21. TLC bacteria MM B44 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.



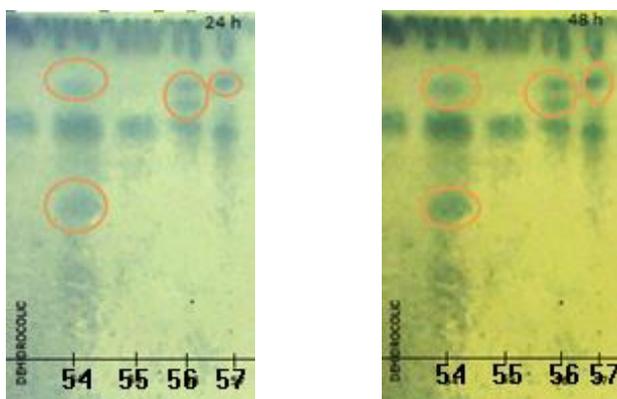
Anexo 22. TLC bacteria MM B45 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2



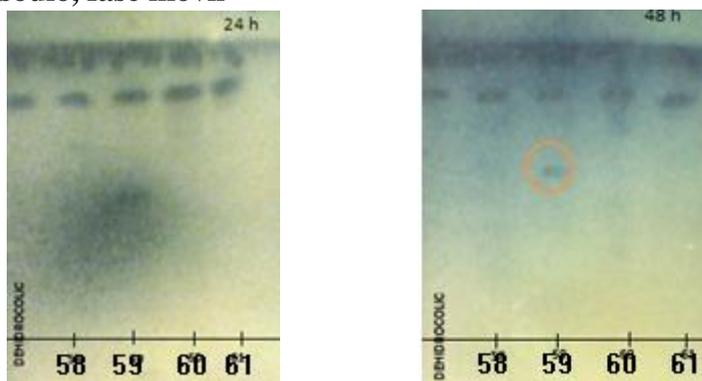
Anexo 23. TLC bacteria MM B52 biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2



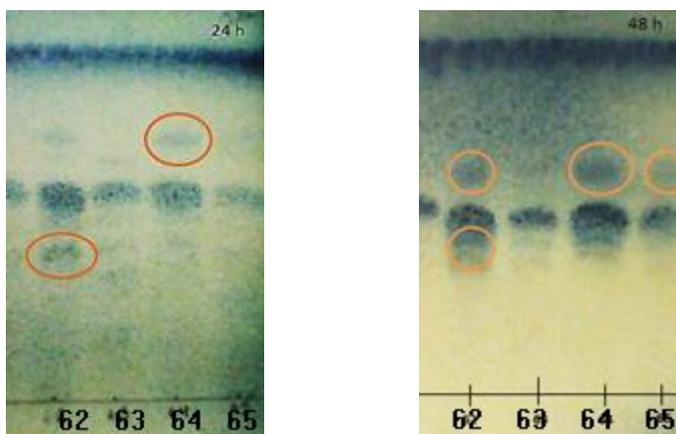
Anexo 24. TLC bacteria MM B54, MM B56, MM B57, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2



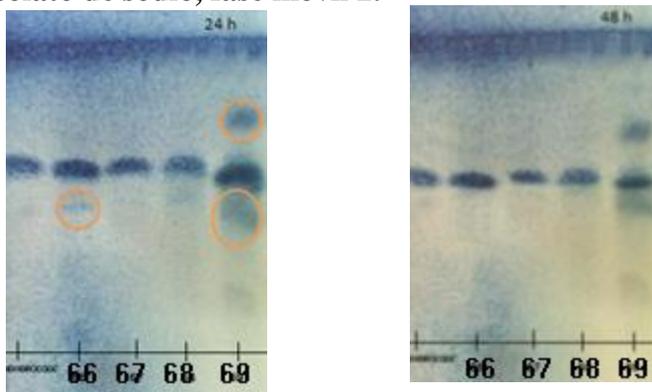
Anexo 25. TLC bacteria MM B59, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil



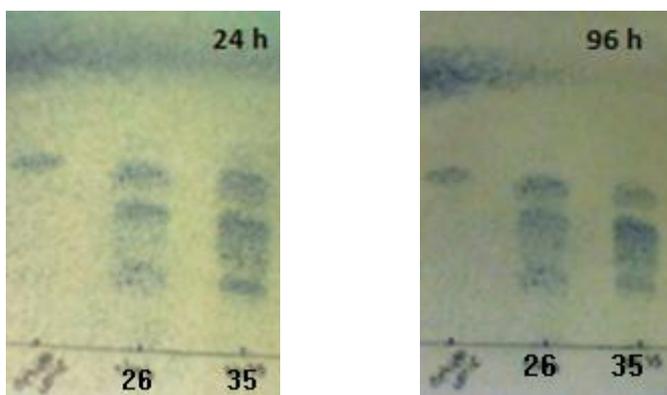
Anexo 26. TLC bacteria MM B62, MM B64, MM B65, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2



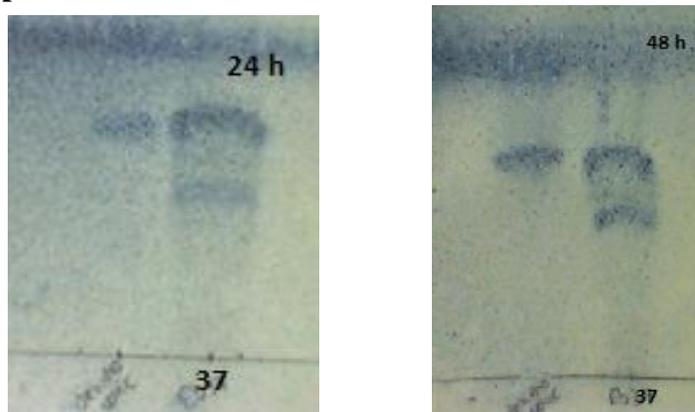
Anexo 27. TLC bacteria MM B66, MM B69, biotransformación a las 24 y 48 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.



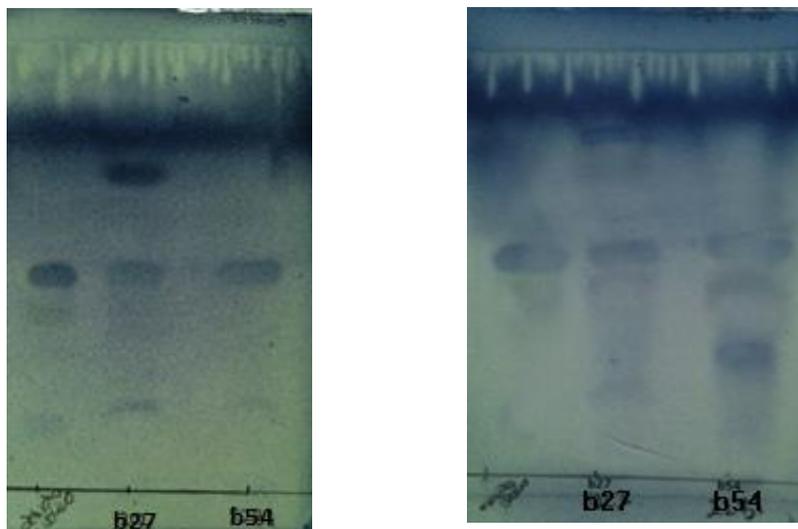
Anexo 28. TLC bacteria MM B26, MM B35, lectura a las 24 y 96 horas, dehidrocolato de sodio, cultivo preparativo. Fase móvil 1



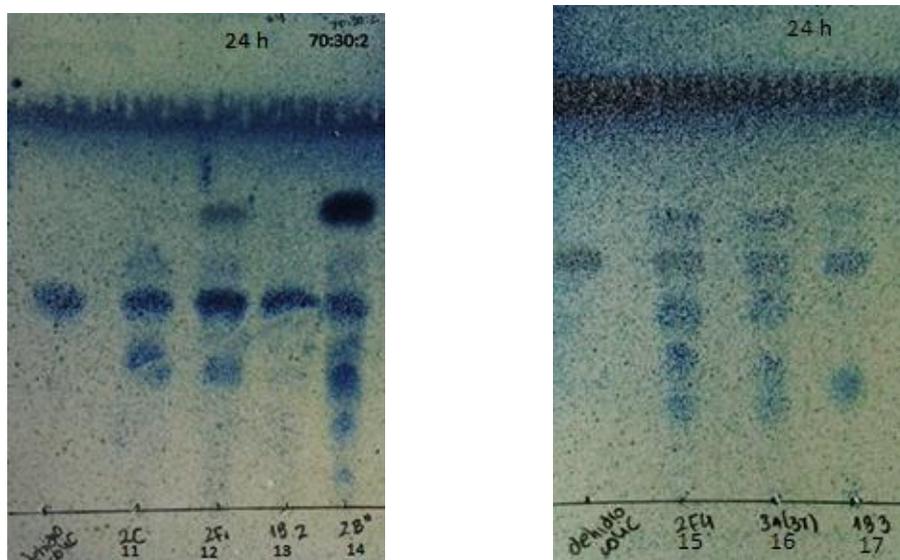
Anexo 29. TLC bacteria MM B37, lectura a las 24 y 48 horas, dehidrocolato de sodio, cultivo preparativo. Fase móvil 1



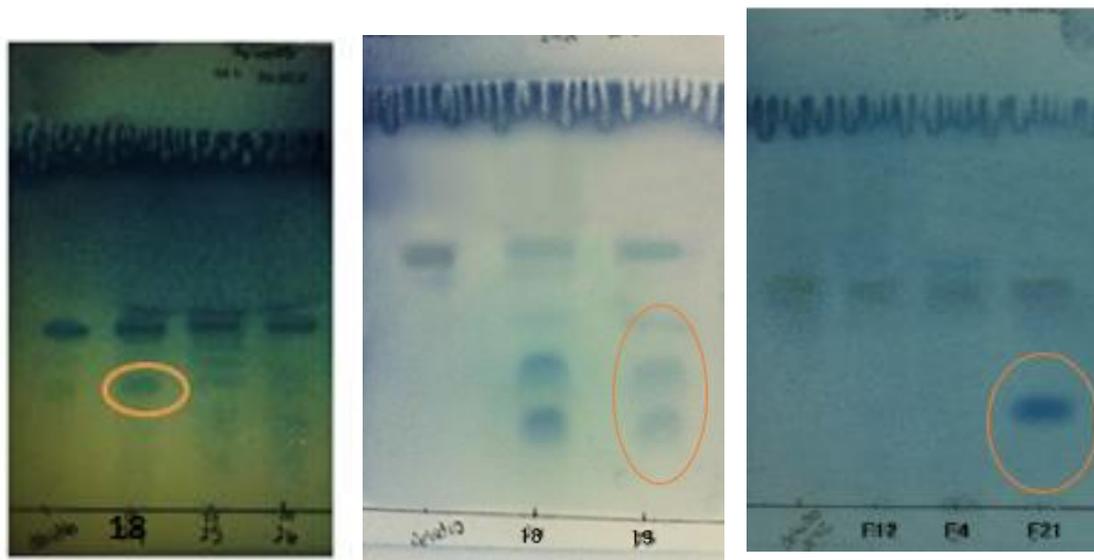
Anexo 30. TLC bacteria MM B27, MM B54, lectura a las 24 y 48 horas, dehidrocolato de sodio, cultivo preparativo. Fase móvil 2



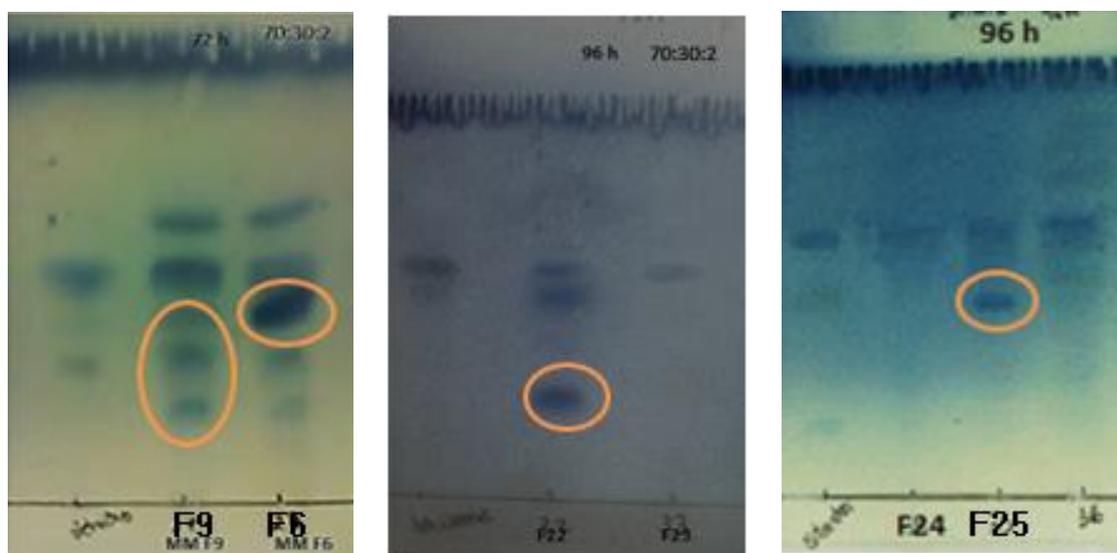
Anexo 31. TLC hongo MM F11, MM F12, MM F14, MM F15, MM, F16, MM F17, biotransformación a las 24 horas con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.



Anexo 32. TLC hongo MM F18, MM F19, MM F21, biotransformación con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.



Anexo 33. TLC hongo MM F22, MM F25, MM F9, MM F6; biotransformación con dehidrocolato de sodio, fase móvil 2.



Anexo 34. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B30 (colato de sodio)

Microgen ID					
Microgen GNA+ B Oxidase Negative					
Specimen Details					
<i>Lab Ref.:</i>					<i>Date:</i> 01/07/2013
<i>Name:</i>					
<i>Specimen Type:</i> MM B30					
<i>Source (ward/location):</i>					
Results Entry					
<i>Octal Code:</i> 05405152					
- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production			
+ GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose			
+ ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis			
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase			
+ GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol			
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose			
+ LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol			
- RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase			
Identification Analysis					
	<i>S.marcescens biogr 1</i>	<i>E.agglomerans complex</i>	<i>K.ozonae</i>	<i>S.plymuthica</i>	<i>E.coli-inactive</i>
<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No
<i>Probability</i>	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
<i>Percent Probability</i>	94.31%	3.18%	2.33%	0.15%	0.02%
<i>Likelihood</i>	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
<i>Human Isolate</i>	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Tests against</i>					
<i>Test 1</i>	XYL (0.1%)	MAN (99.9%)	MAN (99.9%)	MAN (99.9%)	GEL (0.1%)
<i>Test 2</i>	MAN (96%)	GEL (2%)	GEL (0.1%)	ARA (99.9%)	INO (1%)
<i>Test 3</i>	LAC (4%)	ARA (95%)	ARA (98%)	ADO (0.1%)	ADO (3%)
<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>DNase (25C)</i>	82%	0.1%	0.1%	99.9%	0.1%
<i>Motility (37C)</i>	17%	85%	0.1%	50%	5%
<i>Acid from Cellobiose</i>	4%	55%	92%	88%	2%
<i>Esculin Hydrolysis</i>	96%	60%	80%	81%	5%
<i>Additional Comments</i>					21
	21 Previously the Alkalescens Dispar (ADO) Group				
Identification Comments					
Acceptable Identification of <i>Serratia marcescens</i> biogr 1					
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices					
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.					

Anexo 36. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B42 (colato de sodio)

Microgen ID					
Microgen GNA + B Oxidase Positive					
Specimen Details					
<i>Lab Ref.:</i>	<i>Date:</i> 01/07/2013				
<i>Name:</i>					
<i>Specimen Type:</i> MM EB42					
<i>Source (ward/location):</i>					
Results Entry					
<i>Octal Code:</i> 540522001					
+ OXI Oxidase	- MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction			
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production			
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose			
+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis			
- VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase			
- GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol			
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose			
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol			
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase			
Identification Analysis					
<i>Select ID Choice</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Ps.fluorescens-25</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Moraxella spp.</i>
<i>Probability</i>	Yes	No	No	No	No
<i>Percent Probability</i>	1/11,660,137	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
<i>Likelihood</i>	95.37%	2.92%	1.43%	0.14%	0.13%
<i>Human Isolate</i>	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
<i>Tests against</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Test 1</i>	ONP (0.1%)	ONP (0.1%)	MOT (99.9%)	ONP (0.1%)	ONP (0.1%)
<i>Test 2</i>	MOT (93%)	MOT (94%)	ONP (0.1%)	UR (0.1%)	ARG (0.1%)
<i>Test 3</i>	GLU (85%)	UR (7%)	ARG (14%)	NIT (5%)	MAL (2%)
<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Growth on Cetrimide</i>	94%	89%	0.1%	80%	0%
<i>Growth at 42C</i>	99.9%	0.1%	69%	0.1%	24%
<i>Growth in 6% NaCl</i>	65%	43%	80%	43%	8%
<i>Additional Comments</i>					
Identification Comments					
Acceptable Identification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices					
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.					

Anexo 37. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B37 (colato de sodio).

Microgen ID					
Microgen GNA + B Oxidase Positive					
Specimen Details					
Lab Ref.:	Date: 01/07/2013				
Name:					
Specimen Type: MM B37					
Source (ward/location):					
Results Entry					
Octal Code: 507400556					
+ OXI Oxidase	- MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction			
- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production			
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose			
+ ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis			
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Desaminase			
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol			
+ SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose			
+ LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol			
+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase			
Identification Analysis					
	<i>Pasteurella</i>				
	<i>P. haemolytica</i>	<i>Actinobacillus spp.</i>	<i>P. multocida</i>	<i>B. pseudomallei</i>	<i>A. hydrophila</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/1,773,871	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	100%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	SAL (0.1%)	UR (99.9%)	ADO (0.1%)	MOT (99.9%)	MOT (99.9%)
Test 2	ADO (10%)	ADO (0.1%)	RAF (1%)	ONP (0.1%)	XYL (1%)
Test 3	LAC (20%)	SOR (5%)	SAL (1%)	INO (95%)	IND (99%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth on SS Agar	0.1%	0.1%	0.1%	8%	97%
Oxidation of Glucose	0.1%	0.1%	0.1%	99.9%	0.1%
Growth on MacConkey	79%	82%	2%	99.9%	99.9%
Esculin Hydrolysis	25%	0.1%	0.1%	50%	84%
Growth at 42C	50%	15%	32%	99.9%	84%
Additional Comments	5 Previously <i>Pseudomonas pseudomallei</i>				5
Identification Comments					
Acceptable Identification of <i>Pasteurella haemolytica</i> The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.					

**Anexo 38. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B45
(dehidrocolato de sodio)**

Microgen ID

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: Date: 01/07/2013
 Name:
 Specimen Type: 21c1
 Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 461162021

- | | | |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| + OXI Oxidase | - MOT Motility | - NIT Nitrate Reduction |
| + LYS Lysine Decarboxylase | + ORN Ornithine Decarboxyl | - H2S H2S Production |
| - GLU Acid from Glucose | - MAN Acid from Mannitol | + XYL Acid from Xylose |
| - ONP ONPG | - IND Indole | + UR Urea Hydrolysis |
| + VP Voges Proskauer | + CIT Citrate Utilization | - TDA Tryptophan Deaminase |
| - GEL Gelatin Liquefaction | + MAL Malonate Inhibition | - INO Acid from Inositol |
| - SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | - SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | + ARA Acid from Arabinose | - ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | - SAL Acid from Salicin | + ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Ps.fluorescens-25</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Moraxella spp.</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	99.65%	0.34%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	VP (0.1%)	ORN (0.1%)	MOT (99.9%)	ORN (0.1%)	XYL (0.1%)
Test 2	ORN (3%)	VP (0.1%)	ORN (0.1%)	XYL (0.1%)	VP (0.1%)
Test 3	MOT (93%)	MOT (94%)	VP (0.1%)	UR (0.1%)	ARA (0.1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth on SS Agar	96%	96%	99.9%	86%	0.1%
Growth at 42C	99.9%	0.1%	0.1%	0.1%	24%

Additional Comments

Identification Comments

Acceptable Identification of *Pseudomonas aeruginosa*
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

**Anexo 39. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B54
(dehidrocolato de sodio)**

Microgen ID

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: Date: 01/07/2013
 Name:
 Specimen Type: 22b1
 Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 441240001

- | | | |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| + OXI Oxidase | - MOT Motility | - NIT Nitrate Reduction |
| + LYS Lysine Decarboxylase | - ORN Ornithine Decarboxyl | - H2S H2S Production |
| - GLU Acid from Glucose | - MAN Acid from Mannitol | + XYL Acid from Xylose |
| - ONP ONPG | + IND Indole | - UR Urea Hydrolysis |
| + VP Voges Proskauer | - CIT Citrate Utilization | - TDA Tryptophan Deaminase |
| - GEL Gelatin Liquefaction | - MAL Malonate Inhibition | - INO Acid from Inositol |
| - SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | - SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | - ARA Acid from Arabinose | - ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | - SAL Acid from Salicin | + ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

	<i>V.carchariae</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>W.virosa</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	87.32%	8.83%	2.9%	0.24%	0.17%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	NIT (99.9%)	MOT (99.9%)	XYL (0.1%)	IND (0.1%)	LYS (0.1%)
Test 2	XYL (0.1%)	IND (0.1%)	IND (0.1%)	VP (0.1%)	XYL (0.1%)
Test 3	ARG (0.1%)	VP (0.1%)	VP (0.1%)	CIT (95%)	VP (0.1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth on MacConkey	0%	99.9%	99.9%	99.9%	3%
Growth at 42C	0%	0.1%	0.1%	99.9%	65%
Growth in 6% NaCl	99.9%	44%	43%	65%	0%

Additional Comments

9 Previously CDC group III, occasionally isolated from urine and vaginal samples

Identification Comments

Acceptable Identification of *Vibrio carchariae*
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

**Anexo 40. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B35
(dehidrocolato de sodio)**

Microgen ID

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.:

Date: 01/07/2013

Name:

Specimen Type: 31a3

Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 407641460

+ OXI Oxidase	- MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction
- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose
+ ONP ONPG	+ IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
+ VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	+ INO Acid from Inositol
+ SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>P.multocida</i>	<i>P.haemolytica</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>B.pseudomallei</i>	<i>A.caviae</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	96.33%	3.67%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	VP (0.1%)	IND (0.1%)	MOT (99.9%)	MOT (99.9%)	MOT (99.9%)
Test 2	ARA (3%)	VP (0.1%)	INO (0.1%)	ONP (0.1%)	NIT (99.9%)
Test 3	INO (5%)	NIT (95%)	XYL (1%)	IND (0.1%)	INO (0.1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth on SS Agar	0.1%	0.1%	97%	8%	0%
Oxidation of Glucose	0.1%	0.1%	0.1%	99.9%	0.1%
Growth on MacConkey	2%	79%	99.9%	99.9%	99.9%
Esculin Hydrolysis	0.1%	25%	84%	50%	84%
Growth at 42C	32%	50%	84%	99.9%	0%
Additional Comments				5	

5 Previously Pseudomonas pseudomallei

Identification Comments

Acceptable Identification of *Pasteurella multocida*
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

**Anexo 41. Identificación con pruebas bioquímicas, bacteria MM B27
(dehidrocolato de sodio)**

Microgen ID

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: Date: 01/07/2013
 Name:
 Specimen Type: 12c2
 Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 405050021

- | | | |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| + OXI Oxidase | - MOT Motility | - NIT Nitrate Reduction |
| - LYS Lysine Decarboxylase | - ORN Ornithine Decarboxyl | - H2S H2S Production |
| + GLU Acid from Glucose | - MAN Acid from Mannitol | + XYL Acid from Xylose |
| - ONP ONPG | - IND Indole | - UR Urea Hydrolysis |
| + VP Voges Proskauer | - CIT Citrate Utilization | + TDA Tryptophan Deaminase |
| - GEL Gelatin Liquefaction | - MAL Malonate Inhibition | - INO Acid from Inositol |
| - SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | - SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | + ARA Acid from Arabinose | - ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | - SAL Acid from Salicin | + ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

	<i>V.damsela/ P.damsela</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Ps.fluorescens-25</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>P.multocida</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	99.93%	0.04%	0.03%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	NIT (99.9%)	VP (0.1%)	VP (0.1%)	MOT (99.9%)	VP (0.1%)
Test 2	XYL (0.1%)	TDA (0.1%)	CIT (99.9%)	VP (0.1%)	TDA (0.1%)
Test 3	TDA (0.1%)	CIT (95%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	ARG (1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth on MacConkey	0%	99.9%	99.9%	99.9%	2%
Growth at 42C	0%	99.9%	0.1%	0.1%	32%
Growth in 6% NaCl	95%	65%	43%	44%	2%

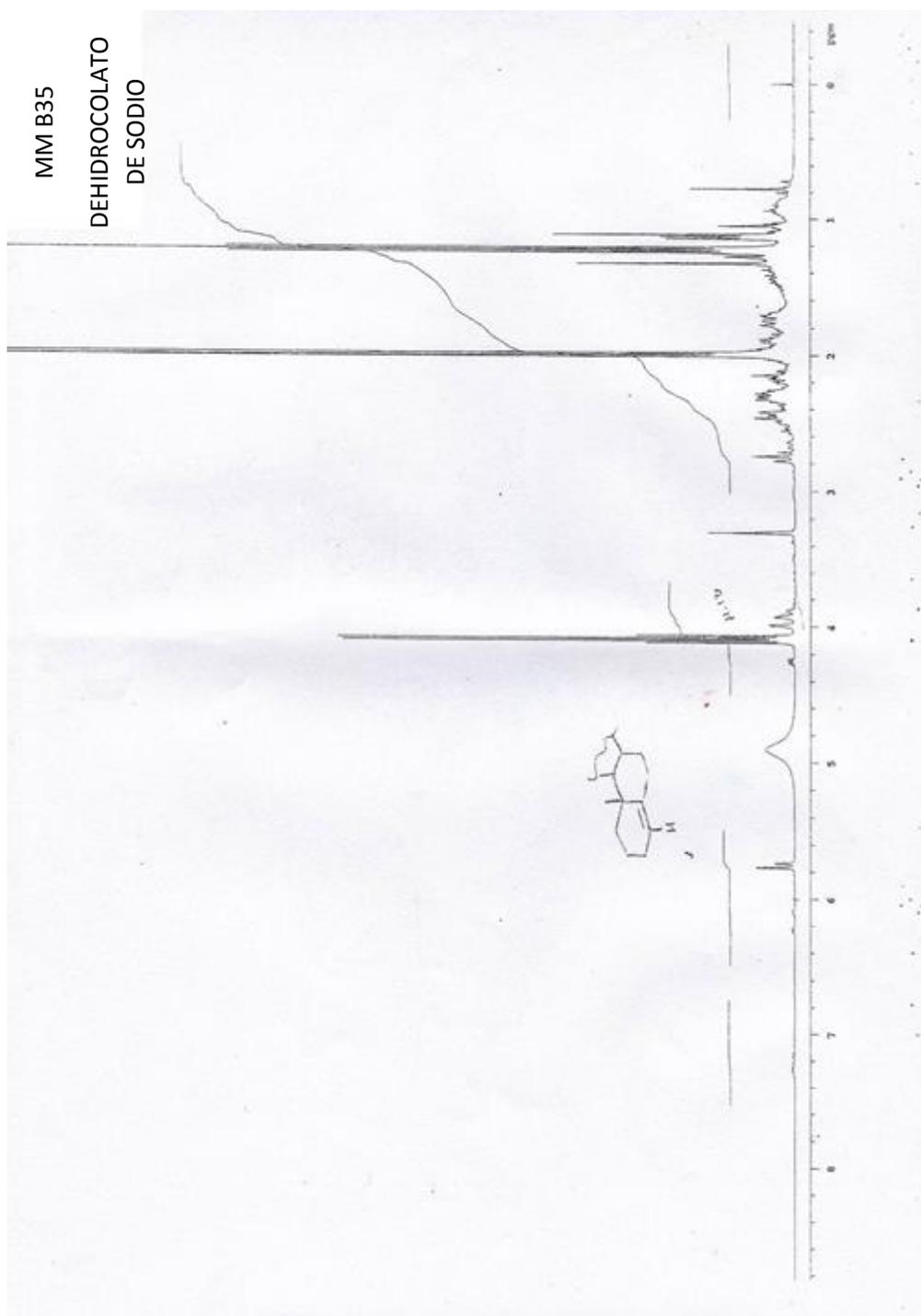
Additional Comments 12
 12 Int. J. Syst. Bacteriol. (1991) 41:529 - 534

Identification Comments

Acceptable Identification of *Vibrio damsela/ Photobacterium damsela*
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

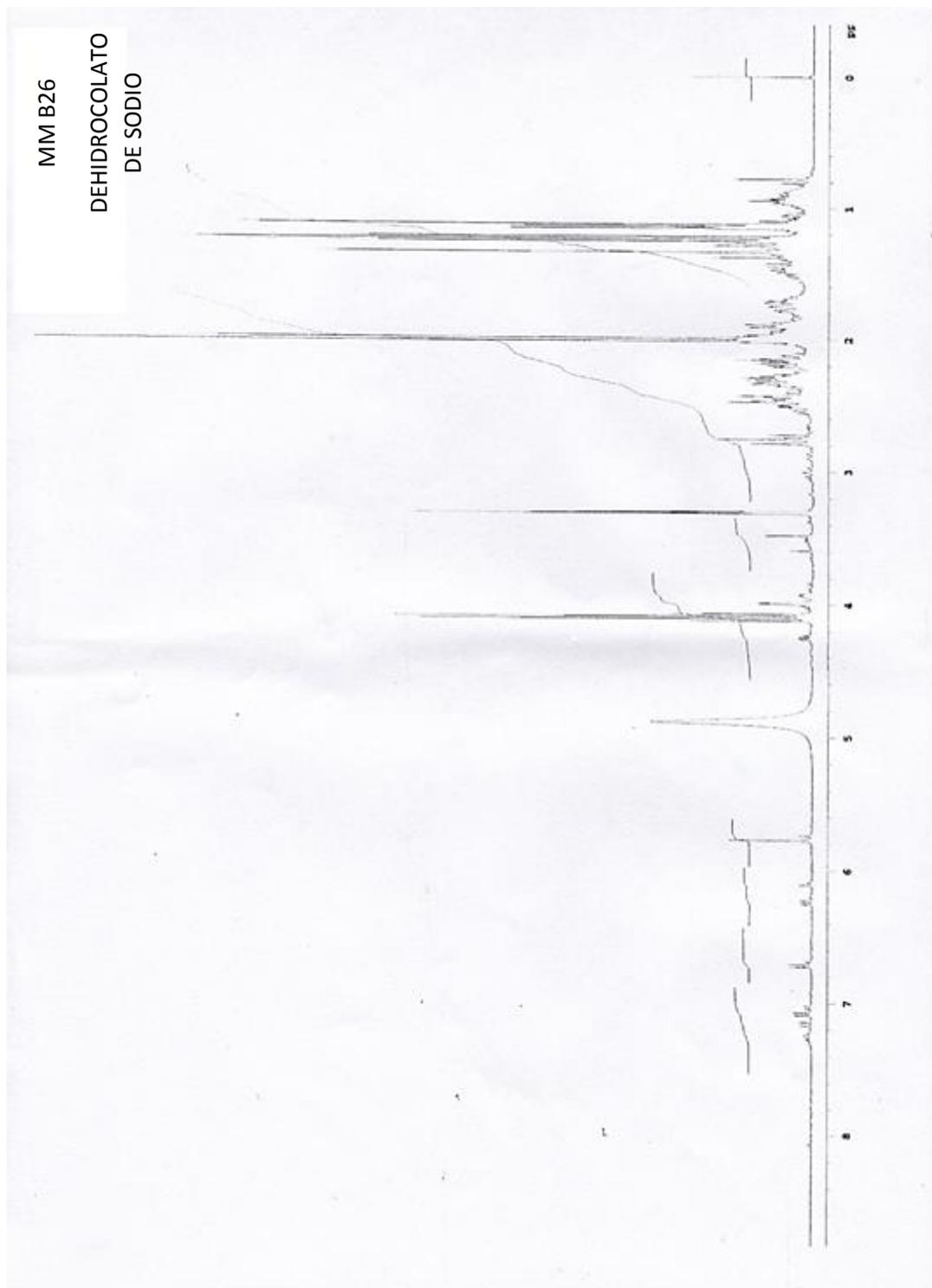
Anexo 42. Resonancia magnética nuclear

MM B35: Dehidrocolato de sodio



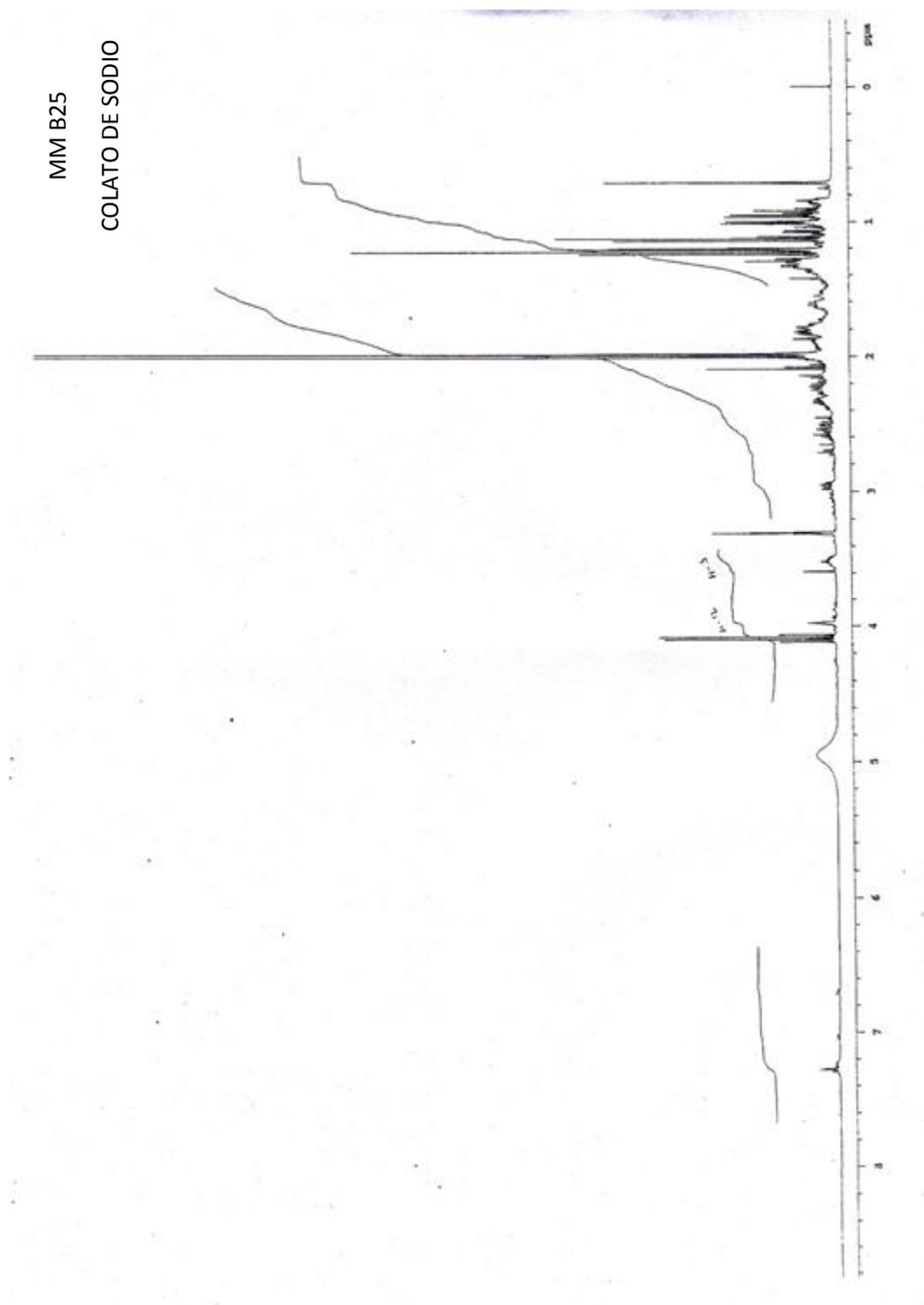
Anexo 43. Resonancia magnética nuclear

MM B26: Ácido dehidrocólico



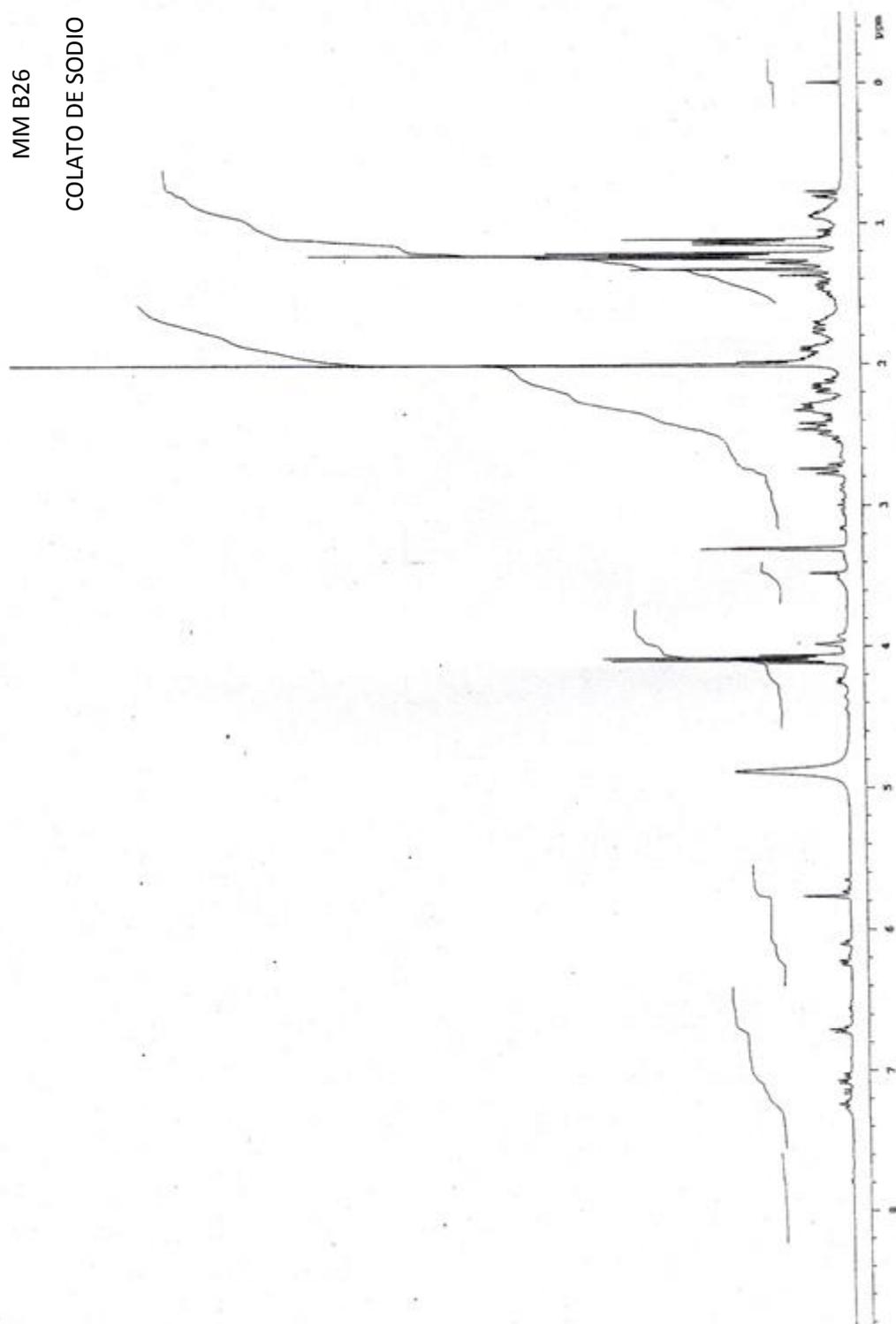
Anexo 44. Resonancia magnética nuclear

MMB25: Colato de sodio



Anexo 45. Resonancia magnética nuclear

MMB26: Colato de sodio



Anexo 46. Fotografías tomadas en investigación de los camales del Ecuador



Foto: Entrada a la instalaciones del Camal frigorífico de Riobamba.

Autor: Juan Pineda



Foto: Instalaciones del Camal Municipal de Riobamba

Autor: Andrés Daza



Foto: Vesícula biliar de ganado vacuno

Fuente: Andrés Daza



Foto: Recolección de la bilis para posterior medición en vaso de precipitación en el laboratorio.

Fuente: Andrés Daza



Foto: Vesícula biliar de ganado porcino.

Fuente: Juan Pineda



Foto: Desechos vertidos directamente a la alcantarilla

Fuente: Andrés Daza



Foto: Vísceras de ganado vacuno y porcino

Fuente: Andrés Daza



Foto: Recolección de desechos

Fuente: Juan Pineda



Foto: Desechos ganado bovino, ganado porcino

Fuente: Andrés Daza



Foto: Ing. Adela Ortiz, Directora del Camal Municipal Ambato.

Fuente: Juan Pineda



Foto: Desechos de ganado bovino y porcino. Camal Municipal de Guayaquil

Fuente: Andrés Daza



Fotos: Procesamiento de vísceras de ganado.

Fuente: Andrés Daza