

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE QUITO**

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

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN  
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LA SAL  
SÓDICA DEL ÁCIDO DESOXICÓLICO POR ACTINOMICETOS**

**AUTORA:**

**JESSICA ALEXANDRA BELTRÁN ORTIZ**

**TUTORA:**

**MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ**

**Quito, marzo del 2015**

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

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

Además declaro que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones de este trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, marzo del 2015.

(f)\_\_\_\_\_

Jessica Alexandra Beltrán Ortiz

CI: 1724024862

## **DEDICATORIA**

Dedico con todo mi amor este trabajo de grado a Dios y a cada una de las personas que fue parte del arduo proceso de mi formación, en especial a mi madre, padre y hermanas, por brindarme el apoyo y la guía que necesité para culminar este primer gran paso de mi futuro profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Politécnica Salesiana por abrirme las puertas de sus aulas y lograr mi excelente formación profesional y humana.

A mi directora de tesis, Dra. María Elena Maldonado, por incluirme en su proyecto de investigación y guiarme en la elaboración de este trabajo de grado.

A la Dra. Valentina Venturi y al Dr. Luis Valdés, por compartirme su invaluable conocimiento durante el desarrollo de mi tesis y su amistad incondicional.

Al personal del CIVABI, directores, ayudantes, personal de limpieza y en general, por hacer que el trabajo en las instalaciones de este centro de investigación sea confortable y ameno.

A mis compañeros tesisistas, que en diferentes áreas, colaboraron durante la elaboración de mi tesis.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
1.1. Esteroides .....	4
1.2. Tipos de esteroides.....	5
1.3. El colesterol .....	6
1.3.1. Rutas metabólicas del colesterol .....	8
1.4. Ácidos biliares .....	9
1.4.1. Ácidos biliares presentes en la bilis .....	9
1.4.2. Síntesis de ácidos biliares .....	9
1.4.3. Función de los ácidos biliares .....	12
1.5. Ácido Desoxicólico.....	12
1.5.1. Función del ácido desoxicólico.....	13
1.6. Ácido Ursodesoxicólico.....	14
1.6.1. Aplicaciones del ácido ursodesoxicólico .....	15
1.6.1.1. Tratamiento para la litiasis biliar (cálculos biliares de colesterol) .....	15
1.6.1.2. Tratamiento con ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico .....	16
1.7. Cromatografía en Capa Fina .....	17
1.7.1. Cromatografía en Capa Fina (CCP).....	18
1.7.1.1. Sílica gel y alumina.....	18
1.7.1.2. Reveladores.....	18
1.8. Resonancia Magnética Nuclear.....	19
1.9. Actinomicetos .....	20

1.9.1.	Características de los actinomicetos .....	20
1.9.2.	Géneros de actinomicetos .....	21
1.9.3.	Aplicaciones.....	22
1.9.3.1.	Ambientales .....	22
1.9.3.2.	Industriales .....	23
1.10.	Biotecnología .....	23
1.10.1.	Aspectos Generales .....	23
1.10.2.	Biotecnología en Ecuador .....	24
1.10.3.	Biotransformación.....	25
1.11.	Identificación de microorganismos .....	26
1.11.1.	Pruebas bioquímicas .....	26
1.11.2.	Caracterización fenotípica de microorganismos .....	27
1.11.2.1.	Fundamento de la tinción de Gram .....	27
1.11.2.2.	Cinética de Crecimiento Microbiano .....	28
1.11.2.3.	Medida del crecimiento microbiano .....	30
1.11.3.	Caracterización genotípica.....	30
1.11.3.1.	Extracción de ADN.....	30
1.11.3.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	31
1.11.3.3.	Electroforesis .....	32

## **CAPÍTULO 2**

<b>2.</b>	<b>MATERIALES, MÉTODOS Y REACTIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1.	FASE I: Muestreo .....	33
2.1.1.	Delimitación de la zona de muestreo .....	33
2.1.1.1.	Provincia de Morona Santiago.....	33
2.1.1.2.	Provincia de Pichincha.....	35

2.1.2.	Selección de áreas específicas de muestreo .....	36
2.1.3.	Materiales y métodos para el muestreo.....	37
2.2.	FASE II. Aislamiento y purificación .....	37
2.2.1.	Preparación de diluciones .....	37
2.2.2.	Cultivo en medio sólido .....	38
2.3.	FASE III. Screening microbiológico .....	40
2.3.1.	Cultivo en medio líquido ATT.....	40
2.3.2.	Siembra de la sal sódica del ácido desoxicólico .....	41
2.3.3.	Preparación de la muestra para el análisis por CCF .....	42
2.3.4.	Escalamiento del cultivo. ....	42
2.4.	FASE IV: Análisis mediante RNM.....	43
2.4.1.	Extracción del compuesto a identificar.....	43
2.4.2.	Placa Preparativa.....	44
2.4.3.	Identificación del compuesto .....	45
2.5.	Identificación de actinomicetos .....	45
2.5.1.	Tinción de Gram .....	45
2.5.2.	Pruebas Bioquímicas.....	46
2.5.3.	Caracterización Fenotípica.....	46
2.5.4.	Caracterización genotípica.....	47

### **CAPÍTULO 3**

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
3.1. De la selección de las zonas de muestreo .....	50
3.2. Del aislamiento y purificación de actinomicetos .....	51
3.3. Del Screening de la capacidad de biotransformación de los Actinomicetos aislados	53

3.4.	De la selección de las cepas con máxima capacidad de biotransformación .....	57
3.5.	De la interpretación de los espectros .....	59
3.6.	De la identificación de la cepa MMAE-17A .....	60
3.7.	De la caracterización fenotípica.....	61
3.7.1.	Morfología .....	61
3.7.2.	Medición de células .....	62
3.7.3.	Cinética de Crecimiento.....	63
3.8.	De la caracterización genotípica .....	64
3.8.1.	Extracción de ADN.....	64
3.8.2.	Concentración y Calidad de ADN .....	66
3.8.3.	Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	67
	CONCLUSIONES .....	69
	RECOMENDACIONES.....	71
	GLOSARIO .....	72
	LISTA DE REFERENCIAS .....	74
	ANEXOS .....	80



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación de la localidad Camal de Sucúa. ....	34
Tabla 2. Ubicación de la localidad río Machángara.....	35
Tabla 3. Áreas específicas de muestreo. ....	36
Tabla 4. Ficha técnica Columbia Agar.....	38
Tabla 5. Indicaciones para la preparación del producto deshidratado. ....	39
Tabla 6: Componentes del medio líquido ATT.....	41
Tabla 7. Cebadores empleados para la PCR .....	49
Tabla 8. Cepas de actinomicetos aisladas según su procedencia. ....	52
Tabla 9. Referencia del porcentaje de biotransformación.....	54
Tabla 10. Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico.Camal Sucúa. ....	55
Tabla 11. Biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico. Río Machángara. ....	56
Tabla 12. Porcentaje de Biotransformación de cada cepa aislada. ....	58
Tabla 13. Porcentajes de biotransformación en el escalamiento del cultivo.....	58
Tabla 14: Caracterización morfológica de la cepa MMAE-17A. ....	62
Tabla 15. Relación de absorbancia.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del núcleo esteroideo.....	4
Figura 2. Esquema representativo la biosíntesis del colesterol a partir de acetato. ....	7
Figura 3. Estructura de los ácidos biliares primarios: cólico y quenodesoxicólico .....	10
Figura 4. Estructura de los ácidos biliares secundarios desoxicólico y litocólico .....	11
Figura 5. Síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol. ....	11
Figura 6. Estructura del ácido biliar desoxicólico.....	13
Figura 7. Estructura molecular del ácido ursodesoxicólico .....	14
Figura 8. Ubicación del Camal de Sucúa en el mapa.....	34
Figura 9. Ubicación del río Machángara en el mapa. ....	35
Figura 10. Bandas y raspado de placa preparativa.....	44
Figura 11. Gráfica de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico por Actinomicetos, representada en porcentaje. ....	57
Figura 12. Placa Cromatográfica, MMAE-17A, MMAE-19B y MMAE-21A a las 72 horas de control. ....	59
Figura 13: Resultado proporcionado por el Software de Identificación del Sistema Microgen. ....	60
Figura 14: Vista al microscopio de células gram positivas.....	61
Figura 15. Cepa MMAE-17A en medio sólido.....	62
Figura 18. Curva de crecimiento de la cepa MMAE-17An a temperaturas de 15, 25, 35 y 40°C. ....	63
Figura 19. Curva de crecimiento de la cepa MMAE-17An a pHs de 2, 3, 4, 5 y 6. ....	64
Figura 20. ADN de la cepa MMAE-17A en gel de agarosa al 2%. ....	65
Figura 21. Bandas de ADN de cepa MMAE-17A en gel de agarosa al 2%. ....	68

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotos del muestreo.....	80
Anexo 2. Cepas de actinomicetos aisladas y codificadas. ....	81
Anexo 3. Procedimiento Screening de la capacidad de biotransformación. ....	82
Anexo 4. Placas cromatográficas de cepas de actinomicetos. ....	83
Anexo 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido Desoxicólico. ....	85
Anexo 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido 3-ceto-desoxicólico. ....	86

## RESUMEN

Los actinomicetos son microorganismos muy abundantes en los suelos, aguas estancadas, ambientes contaminados, etc. Se les considera en el límite entre bacterias y hongos por sus características morfológicas y reproductivas muy similares a ambos grupos de microorganismos. Generalmente son gram positivos y son resistentes a la penicilina.

Los actinomicetos participan activamente en la producción de antibióticos y en la descomposición de residuos animales y vegetales, por esta razón fueron considerados para estudiar su capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido biliar desoxicólico en estructuras de interés industrial.

Con ayuda de técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina - CCP) y de resonancia magnética nuclear (RMN) se ha dado seguimiento al proceso biotransformativo, encontrando como producto final al ácido 3-ceto-desoxicólico.

Para identificar la cepa de actinomiceto que tuvo mayor capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico, se han empleado varias técnicas: pruebas Microgen, caracterización fenotípica: caracterización morfológica, medición del tamaño celular y cinética de crecimiento y, caracterización genotípica: extracción de ADN e identificación molecular. Se determinó que la cepa encontrada pertenece al género *Streptomyces sp.*

Es oportuno mencionar que el trabajo realizado fue parte del proyecto “Aislamiento de Actinomicetos y su Capacidad para Degradar Estructuras Esteroideas” dirigido por María Elena Maldonado Ph.D., junto con la asesoría técnica de la Dra. Valentina Veturi.

**Palabras clave:** biotransformación, actinomicetos, sal sódica del ácido desoxicólico.

## ABSTRACT

Actinomycetes are ubiquitous microorganisms in the soil, stagnant water, contaminated environments, etc. They are considered in the borderline between bacteria and fungi by their morphological and reproductive characteristics very similar to both groups of microorganisms. They are usually gram-positive and they are resistant to penicillin.

Actinomycetes participate actively in the production of antibiotics and in the decomposition of animal and vegetable waste, therefore they were considered to study their ability to biotransform the sodium salt of bile acid deoxycholic to structures of industrial interest.

Using chromatographic and magnetic resonance techniques, the biotransformative process has been followed. It was found the 3-keto-deoxycholic acid as a final product of the biotransformation.

To identify the strain of actinomycetes, which had the higher biotransformation capacity of the sodium salt of deoxycholic acid, several techniques have been employed: Microgen tests, phenotypic characterization: morphological and kinetic characterization and the cell size and, genotypic characterization: DNA extraction and molecular identification. The microorganism found was one of the gender *Streptomyces*.

This investigation was part of the project "Aislamiento de Actinomicetos y su Capacidad para Degradar Estructuras Esteroides" directed by Maria Elena Maldonado Ph.D. with the technical assistance of Valentina Veturi Ph.D.

**Key words:** biotransformation, actinomycetes, sodium salt of deoxycholic bile acid.

## INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo se han buscado microorganismos que posean la capacidad de biotransformar sustratos en compuestos de interés, en casi todas las áreas de la ciencia. La búsqueda de bacterias, hongos y demás microorganismos que puedan biotransformar ácidos biliares ha sido tema de gran número de investigaciones, entre ellas la de Bortolini et al (1997), Pedrini et al (1999), Maldonado (2013), Pineda & Daza (2014), Araujo & Ruiz (2014), entre otras. De esta manera resulta conveniente continuar con investigaciones tendientes a aislar microorganismos de interés industrial.

La búsqueda de microorganismos capaces de degradar el colesterol inició hace más de 70 años. En el siglo XX, se observó que varias especies de *Mycobacterium* podían utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía. Muchas investigaciones han demostrado que los microorganismos sí son capaces de degradar compuestos esteroidales como los ácidos biliares. Posteriores estudios mencionan que, microorganismos pertenecientes al género *Proactinomyces* son capaces de degradar parcialmente moléculas de colesterol y que algunos de ellos, en particular *Rhodococcus erythropolis*, acumulaba ciertos compuestos estructuralmente relacionados con el colesterol, lo que denotaba su capacidad para transformar esta molécula y su uso potencial para obtener nuevos compuestos (Fernández, 2013, pág. 24).

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas que poseen un esqueleto esteroídico. Se forman a partir de la molécula de colesterol en los hepatocitos (Vaquero, 2013, pág. 10). Pineda & Daza (2014), mencionan que uno de los ácidos biliares de mayor estudio y uso es el ácido ursodesoxicólico, extraído de la bilis de oso. Éste ha sido utilizado desde hace más de 3000 años en la Medicina tradicional China para el tratamiento de cálculos vesiculares y demás problemas hepáticos. Así mismo, Mamianeti (1999) corrobora que se han realizado estudios en los que, con el uso del ácido ursodesoxicólico se ha logrado disolver cálculos vesiculares del colesterol. El ácido ursodesoxicólico tiene el poder de disolver los cálculos arenosos que se forman en la vesícula biliar, por lo que su uso es importante para remediar problemas hepáticos comunes (pág. 200).

Este trabajo de investigación se dirige a estudio de actinomicetos capaces de biotransformar el ácido desoxicólico, producto residual de la síntesis química del ácido ursodesoxicólico, la cual consta de un proceso largo y contaminante de 14 pasos (Daza & Pineda, 2014, pág. 15).

La biotecnología permite hallar procedimientos en los que, el ácido desoxicólico pueda ser utilizado para reducir la contaminación ambiental, así como para su uso industrial en los campos: farmacéutico, agroalimentario, o cosmético. Se ha demostrado la gran capacidad de los Actinomicetos para producir importantes compuestos activos (Soler, 2012, pág. 55), por tales motivos, esta investigación es de gran importancia.

## **Objetivos**

### **Objetivo general:**

Evaluar la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico por microorganismos Actinomicetos provenientes de las provincias de Pichincha y Morona Santiago.

### **Objetivos específicos:**

Aislar microorganismos pertenecientes al grupo de actinomicetos en el Camal de Sucúa y en la ribera del río Machángara en el parque “Las Cuadras”.

Evaluar la capacidad de los actinomicetos aislados de biotransformar la sal sódica del ácido desoxicólico mediante métodos cromatográficos.

Identificar el/los actinomiceto/s que posea/n la mayor capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico.

## **Hipótesis**

### **Hipótesis alternativa:**

Los actinomicetos aislados poseen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido desoxicólico.

### **Hipótesis nula:**

Los actinomicetos aislados no poseen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido desoxicólico.



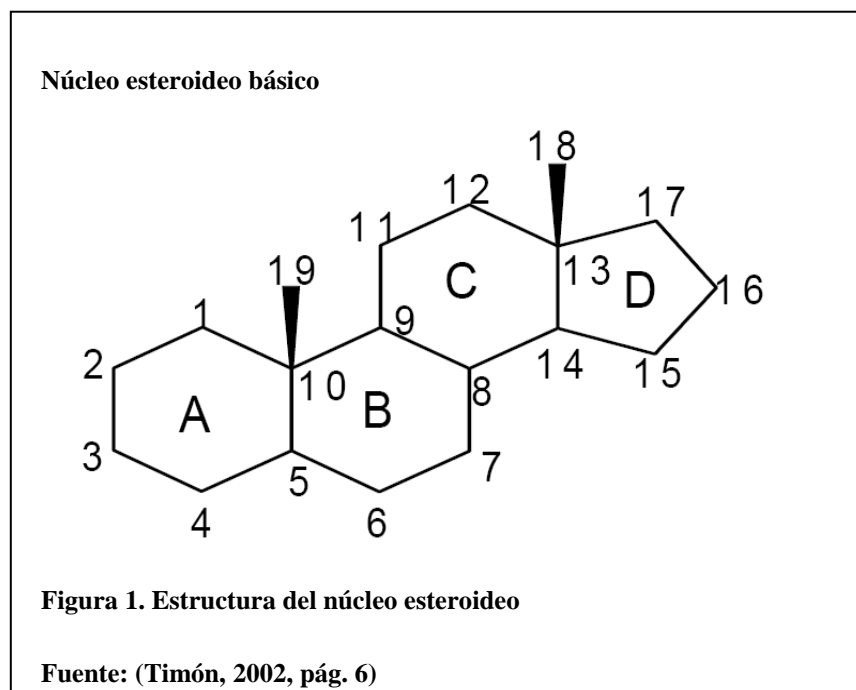
## CAPÍTULO 1

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1.Esteroides

Los esteroides son lípidos complejos derivados del esterano. A partir de su hidrólisis no se obtienen ácidos grasos, son por tanto, lípidos insaponificables.

El nombre general *esteroides* se introdujo en 1936, siendo todos ellos alcoholes secundarios tetracíclicos. Su estructura básica proviene del ciclopentanoperhidrofenantreno (Timón, 2002, pág. 6).



Desde el punto de vista orgánico, los esteroides son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza. El término esteroide tuvo su origen como colessterina (formada a partir del griego *kholé*, que significa bilis, y el adjetivo *stereós* que significa sólido) y era utilizado para nombrar a una sustancia cristalizada a partir de cálculos

biliares humanos. A fines del siglo XVIII, el nombre colestera fue reemplazado por el de colesterol después de encontrar un alcohol en la estructura en esta sustancia. Posteriormente, cuando fueron descubiertos diferentes compuestos de estructura similar al colesterol, todos fueron denominados esteroides. Así, este término no está asociado a una actividad biológica en particular, sino que señala a toda molécula que posea tres anillos de 6 carbonos y un anillo de 5. Conformado así el esqueleto esteroide, puede adquirir distintas conformaciones, según la forma en la cual están fusionados los anillos y el tipo de grupos funcionales presentes (Álvarez, 2009, págs. 3-4).

Un pequeño cambio en los grupos funcionales unidos al esqueleto del esteroide puede dar origen a importantes cambios en la actividad biológica de la molécula (Soler, 2001, pág. 55), por este motivo resulta interesante modificar de forma selectiva la estructura de los esteroides existentes en la naturaleza. Podrían resultar actividades biológicas importantes, por ejemplo el desarrollo de hormonas sexuales, agentes antiinflamatorios, diuréticos así como compuestos útiles en otros sectores industriales como el alimenticio y cosmético (Maldonado, 2013, pág. 92).

## 1.2. Tipos de esteroides

En función de la estructura de básica de los diferentes anillos, Marca (2012) clasifica a los esteroides en seis tipos:

- Estranos: están formados por 18 átomos de carbono. Su estructura está conformada por cuatro anillos combinados que, sobre la estructura del esterano, presentan un metilo en la posición C13<sup>1</sup>. Dentro de este grupo, se encuentran todos los esteroides de tipo estrogénico, es decir, las hormonas sexuales femeninas. La más destacada es la hormona estradiol.
- Androstanos: están formados por cuatro anillos de 19 átomos de carbono. En la estructura del esterano, se incorporan dos metilos, uno en el C10 y otro en el C13.

---

<sup>1</sup>C13: señala al carbono con la numeración 13 en la estructura. De la misma manera se interpreta a sus similares.

Dentro de este grupo, se encuentran todos los esteroides de tipo androgénicos; las hormonas sexuales masculinas. La más destacada es la testosterona, cuyo metabolito más importante es la androsterona.

- Pregnanos: están formados por 21 átomos de carbono. Al sumar 2 átomos de carbono a la estructura básica, se originan la progesterona y los corticoesteroides.
- Esteroles: están formados por 27 átomos de carbono. Estructuralmente se originan a partir del esterano. En estas moléculas, se añade una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono en el carbono 17 y un grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 3. El representante más conocido es el colesterol. Éste es el esteroide más abundante en los seres vivos y está presente en las membranas de todas las células, en el torrente sanguíneo, en la médula espinal, en el cerebro y en las glándulas.
- Vitamina D: es un heterolípido insaponificable del grupo de los esteroides cuyo segundo anillo está roto (págs. 2-5).

### **1.3.El colesterol**

El colesterol es un compuesto esteroideal correspondiente al grupo de los esteroles. Araujo & Ruiz (2014) mencionan que el colesterol es el componente fundamental de las membranas celulares, que regula la fluidez en la membrana y es el precursor de hormonas esteroideas. Se transporta en sangre en forma de lipoproteínas (pág. 12).

A pesar de que todas las células del organismo tienen capacidad para sintetizar colesterol, el hígado es el órgano donde se sintetiza en mayor cantidad, dando lugar a lo que se conoce como colesterol endógeno. Además de la producción, los hepatocitos tienen la capacidad de captar colesterol de las lipoproteínas circulantes y excretarlo para formar parte de nuevas lipoproteínas de origen hepático o transformarlo en ácidos biliares. El colesterol de origen extra hepático procede principalmente de la mucosa intestinal. En el intestino se realiza la absorción del colesterol de la dieta (colesterol exógeno), la biosíntesis del nuevo colesterol y la esterificación para ser almacenado en la célula o secretado a sangre en las lipoproteínas intestinales (Molina, 1991, pág. 6).

Debido a que el colesterol es esencial para la mayoría de las células del organismo, la regulación de su metabolismo es de vital importancia para el buen funcionamiento de las células. En los hepatocitos, esta regulación resulta de un equilibrio entre la llegada de colesterol vía lipoproteínas plasmáticas, la síntesis de *novo* de colesterol en la propia célula y la salida de éste en forma de lipoproteínas y como componente de la bilis. A su vez, el colesterol puede ser almacenado en la célula en forma de éster o formar parte de las membranas celulares como colesterol libre.

### Esquema de la biosíntesis del colesterol

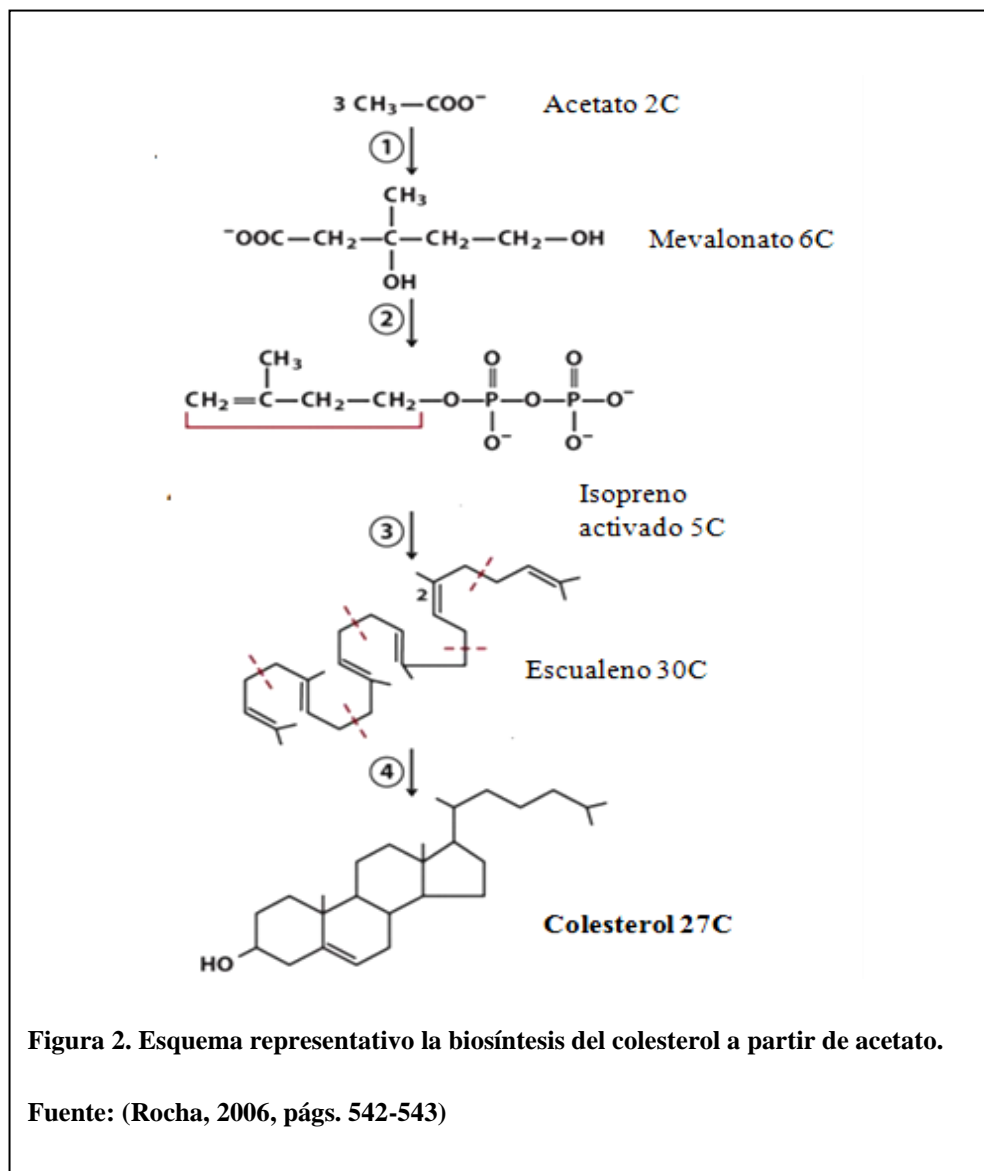


Figura 2. Esquema representativo la biosíntesis del colesterol a partir de acetato.

Fuente: (Rocha, 2006, págs. 542-543)

Rocha (2006) indica que la vía destinada a la síntesis del colesterol parte desde acetil-SCoA, cuyo precursor puede ser originado por carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos. En la primera etapa de la síntesis del colesterol, 3 moléculas de acetil-SCoA generan el 3-hidroxi-3-metil-gluutaril-SCoA el que, mediante una reducción con dos moléculas de NADPH, da origen al ácido mevalónico (5 carbonos). Esta reacción es catalizada por la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCoA-reductasa). El ácido mevalónico es activado por tres moléculas de ATP y pierde un CO<sub>2</sub>, dando origen a la unidad isoprenica soluble llamada isopentenil pirofosfato (IPP). Al encontrarse activo el IPP, puede condensarse para formar el escualeno. Posteriormente, después de sucesivas etapas de oxidación y descarboxilación, el escualeno se convierte en lanosterol, precursor directo del colesterol de 27 átomos de carbono (pág. 543).

### **1.3.1. Rutas metabólicas del colesterol**

El colesterol hepático de fuente endógena y exógena puede sufrir los siguientes procesos (Molina, 1991, pág. 301):

- a) Ser almacenado intracelularmente como colesterol esterificado: el colesterol puede ser almacenado en la célula como éster de ácidos grasos de cadena larga, siendo la enzima responsable de esta reacción la acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa (ACAT). Esta es una enzima microsomal, presente prácticamente en todas las células del organismo, incluido el hígado.
- b) Excretarse en bilis: una de las vías de eliminación hepática del colesterol es su secreción en bilis, como colesterol libre o en forma de ácidos biliares.
- c) Incorporarse a la síntesis de lipoproteínas: otra vía de excreción del colesterol es mediante la formación y secreción de lipoproteínas, principalmente de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL).
- d) Formar parte de las membranas celulares del propio hepatocito: el colesterol libre intercelular del hepatocito también puede ser destinado a la formación de membranas de la misma célula.

## **1.4.Ácidos biliares**

Según Araujo & Ruiz (2013) los ácidos biliares son compuestos con forma de esteroides formados por 24 átomos de carbono dihidroxilados o trihidroxilados, que derivan del colesterol. Entre los principales ácidos biliares destacan:

- El ácido cólico (hidroxilado en la posición C3-C7 y C12 $\alpha$ ).
- El ácido litocólico (hidroxilado en la posición C3 $\alpha$  y C24 $\alpha$ ).
- El ácido desoxicólico (hidroxilado en la posición C3 $\alpha$  y C12 $\alpha$ ).
- El ácido ursodesoxicólico (hidroxilado en la posición C3-7 y C24 $\alpha$ ).
- El ácido 3- $\alpha$  7- $\beta$ -hidroxicolánico.
- El ácido iodesoxicólico (pág. 4).

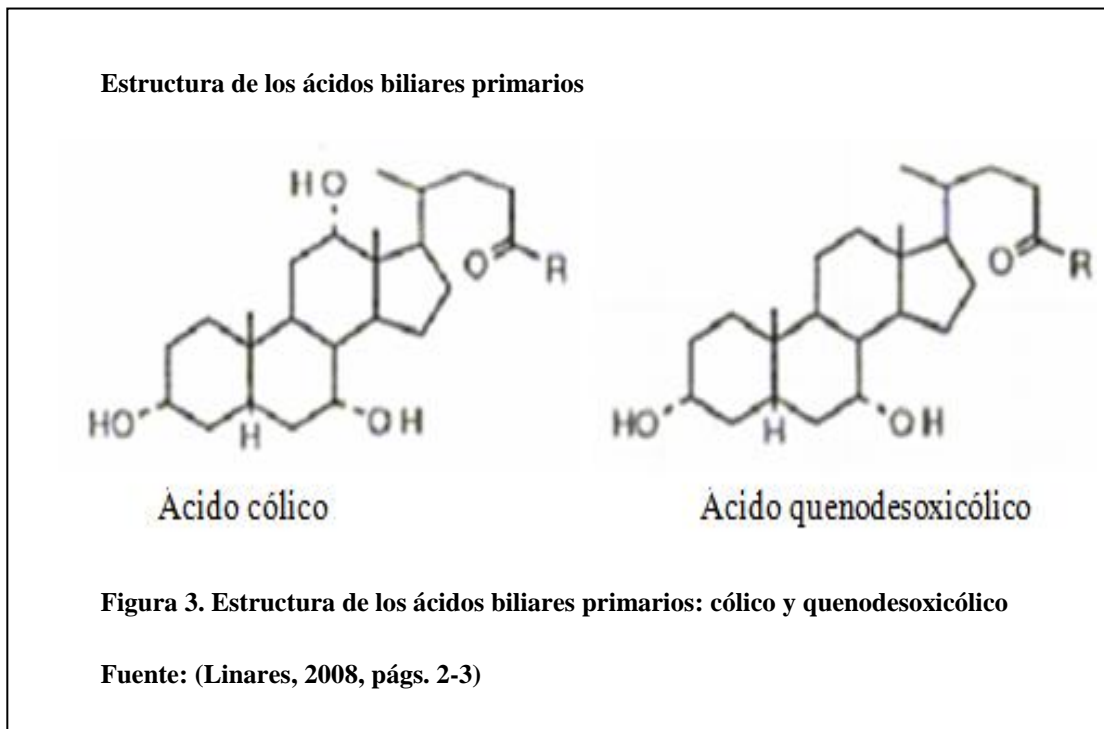
### **1.4.1. Ácidos biliares presentes en la bilis**

La bilis es una sustancia líquida de color verde y sabor amargo producida por el hígado de muchos vertebrados. Interviene en los procesos de digestión funcionando como emulsionante de los ácidos grasos. Contiene proteínas, colesterol, hormonas, agua y sales biliares; un 37% de las sales presentes en la bilis se encuentran en forma 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% (Daza & Pineda, 2014, pág. 4).

### **1.4.2. Síntesis de ácidos biliares**

Los ácidos biliares primarios se sintetizan a partir del colesterol en el hígado y se secretan en forma de sales sódicas a la vesícula o intestino conjugados con taurina o

glicina. Los ácidos biliares primarios son los ácidos cólico y quenodeoxicólico (Araujo & Ruiz, 2014, pág. 15).



En el intestino, una fracción (10-15 %) de los ácidos biliares es desconjugada y luego 7-dehidroxilada por la flora microbiana, dando origen a los ácidos biliares secundarios: el ácido desoxicólico a partir del ácido cólico y el ácido litocólico a partir del ácido quenodesoxicólico. Seguidamente se produce la epimerización del oxidrilo de la posición C7 del ácido quenodesoxicólico para formar el ácido ursodesoxicólico.

La siguiente figura muestra la estructura molecular de los ácidos biliares secundarios formados a partir de los ácidos primarios.

### Estructura de los ácidos biliares secundarios

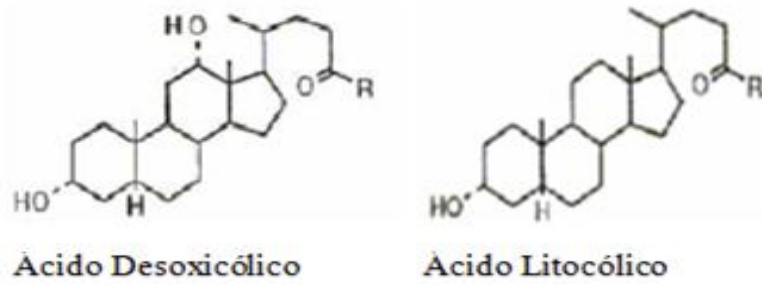


Figura 4. Estructura de los ácidos biliares secundarios desoxicólico y litocólico

Fuente: (Linares, 2008, págs. 2-3).

El siguiente esquema se representa la síntesis del colesterol para obtener ácidos biliares primarios y secundarios.

### Síntesis de ácidos biliares

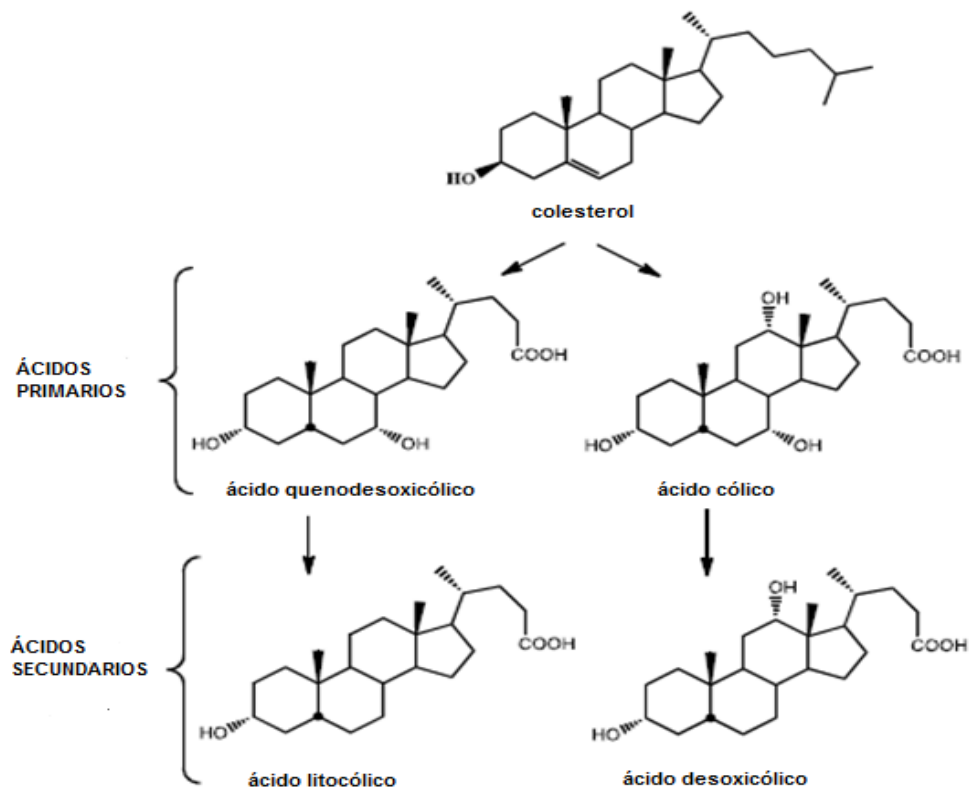


Figura 5. Síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol.

Fuente: (Maldonado, 2013, pág. 22)



### **1.4.3. Función de los ácidos biliares**

Según Lucarelli (2010) los ácidos biliares tienen funciones fisiológicas importantes incluyendo la homeostasis del colesterol, la absorción lipídica, participación en la excreción y recirculación de drogas, vitaminas y toxinas endógenas y exógenas. En condiciones normales se encuentran en bajas concentraciones. Lucarelli (2010, pág. 12) cita a varios estudios que han demostrado la importancia en la determinación de los niveles de ácidos biliares totales en enfermedades hepatobiliares, como alteraciones en la síntesis, metabolismo y *clearance* hepático, e intestinales como alteraciones en la absorción (pág. 1).

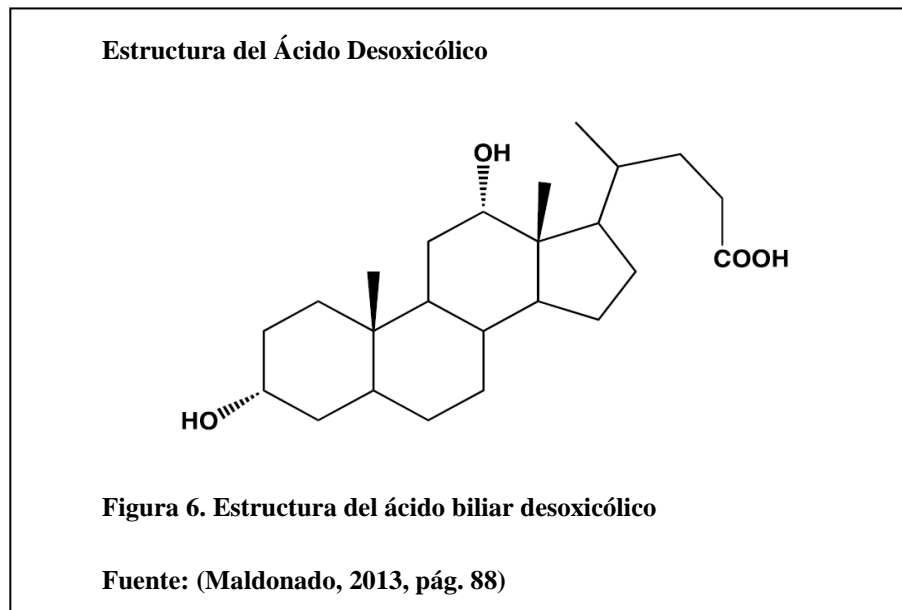
Los ácidos biliares representan el producto terminal del catabolismo hepatocitario del colesterol. La biosíntesis del colesterol a ácidos biliares, modifica la estructura de este esteroide dando origen a moléculas anfipáticas, característica que determina las propiedades principales de los ácidos biliares como por ejemplo la disminución de la tensión superficial para la solubilización de los lípidos de la dieta para favorecer la absorción (Linares, 2008, pág. 1). Algunos ácidos biliares, además de cumplir su función fisiológica también forman parte de la composición de varias formas farmacéuticas, en especial el ácido ursodesoxicólico que es usado en la terapia de algunas patologías hepatobiliares.

Gracias a su peculiar estructura tridimensional y a sus características fisicoquímicas, los ácidos biliares se han constituido en un punto de partida para la aparición de nuevas aplicaciones de compuestos esteroidales en los campos de la biotecnología, química industrial, farmacéutica, cosmetología, etc. (Pineda & Daza, 2014, pág. 2).

### **1.5. Ácido Desoxicólico**

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido desoxicólico es un ácido biliar secundario producido por la reducción del grupo  $7\alpha$ -hidroxilo del ácido cólico por acción de las bacterias intestinales. Constituye uno de los cuatro principales ácidos

producidos por el hígado. Es un componente activo en el organismo, importante en la bilis para la emulsificación de las grasas que llegan al tracto digestivo por ingestión en la dieta (Araujo & Ruiz, 2014, pág. 6).



### 1.5.1. Función del ácido desoxicólico

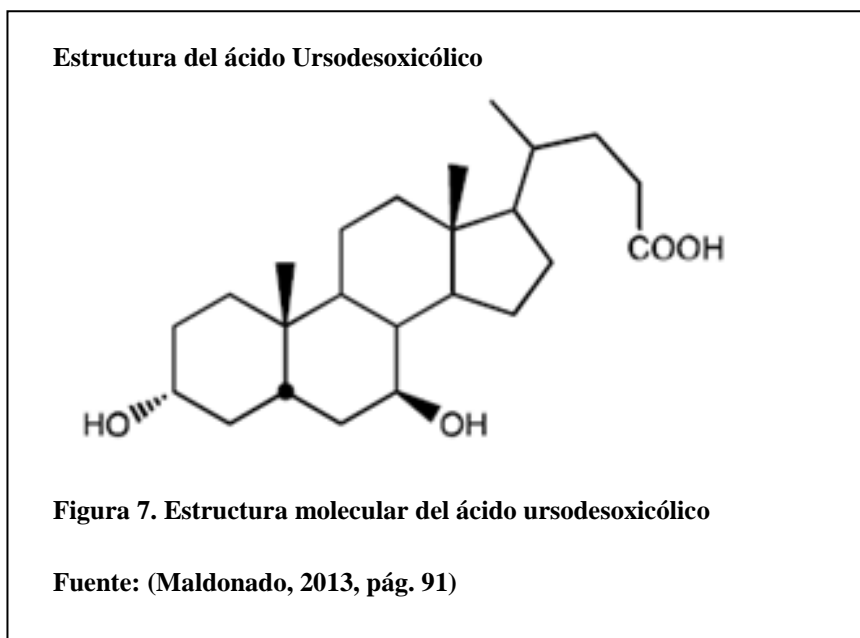
Su principal función en el cuerpo humano es la emulsificación de las grasas para su posterior absorción en el intestino. Fuera del cuerpo se usa en experimentos de base como colagogo (fármacos o extractos de plantas que facilitan la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar, y casi siempre van acompañados de acción purgante intestinal). Ejerce su efecto sobre las proteínas de las membranas celulares, comportándose como un detergente aniónico en concentraciones relativamente bajas. Es usado también en inyecciones de mesoterapia; estimula el metabolismo celular, mejora el aporte de nutrientes a los tejidos, dilata los vasos sanguíneos, tiene una acción de anti radicales libres y estimula al sistema inmune (Araujo y Ruiz, 2014, pág. 7).

La búsqueda de la hidroxilación de ácido desoxicólico en C7 es importante puesto que, se obtendría el ácido cólico, primer compuesto para la síntesis del ácido ursodesoxicólico.

## 1.6.Ácido Ursodesoxicólico

El ácido ursodesoxicólico ( $C_{24}H_{40}O_4$ ) es un ácido biliar presente en pequeñas cantidades en la bilis humana (1-3%) que suprime la síntesis y la secreción del colesterol por el hígado e inhibe la absorción intestinal del colesterol (ACOFARMA, 2011, pág. 1). El ácido ursodesoxicólico se absorbe en el tubo digestivo e ingresa al ciclo enterohepático. Es parcialmente conjugado en el hígado antes de ser excretado por la bilis. Por influencias de las bacterias intestinales, las formas libres y conjugadas sufren una  $7\alpha$ -deshidroxilación pasando a ácido litocólico, parte del cual es excretado directamente por las heces y el resto es absorbido, pero a su vez es sulfatado por el hígado antes de su excreción por las heces.

Su estructura molecular está compuesta por 24 átomos de carbono y posee una hidroxilación en las posiciones C3, C7 y  $24\alpha$ , por lo que constituye un epímero del ácido quenodesoxicólico. La siguiente figura muestra la estructura del ácido ursodesoxicólico.



## **1.6.1. Aplicaciones del ácido ursodesoxicólico**

### **1.6.1.1. Tratamiento para la litiasis biliar (cálculos biliares de colesterol)**

La litiasis biliar se define como:

La presencia de cálculos en algún lugar de la vía biliar que puede ocasionar problemas obstructivos. La formación de estos cálculos guarda relación con situaciones que conllevan un aumento del colesterol o una disminución de la concentración de los ácidos biliares en la bilis, bien sea por disminución de la síntesis o por pérdidas aumentadas en el intestino” (Juste, 2005, pág. 8).

Según los datos de la investigación realizada por Ibrahim (2012, pág. 60) los cálculos biliares de colesterol representan la enfermedad más común de la vesícula biliar, uno de los padecimientos más frecuentes que implica elevados costos en los sistemas de salud. En Estados Unidos la enfermedad prevalece en el 10-15% de la población adulta, principalmente por causa de obesidad, alimentación rica en grasas y sedentarismo. El tratamiento farmacológico para cálculos de colesterol es limitado, cuando el cálculo es sintomático, el tratamiento estándar es la cirugía para la extirpación de la vesícula biliar (colecistectomía).

Maldonado (2013) indica que hasta los años 70 la cirugía fue el único tratamiento terapéutico contra los cálculos biliares. En algunos países se sigue utilizando este tratamiento, por ejemplo en Ecuador, donde esta enfermedad tiene una fuerte presencia debido a una dieta rica en grasas. Sin embargo, en la actualidad muchos pacientes son tratados con ácido quenodesoxicólico y ácido ursodesoxicólico como terapia alternativa ya que, varios estudios han demostrado que los cálculos biliares arenosos se solubilizan si entran en contacto con estas sustancias (pág. 91).

Según Maldonado (2013), los mecanismos por los cuales ocurre esto son varios:

- Disminución de la secreción de colesterol en la bilis, debido a la reducción de la síntesis hepática de colesterol en sí y su absorción en el intestino.
- El aumento de la cantidad total de ácidos biliares que favorecen el solubilización micelar de colesterol.
- Formación de una mesofase líquido-cristalina que permite solubilizar el colesterol más eficientemente (pág. 92).

### **1.6.1.2. Tratamiento con ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico**

El ácido quenodesoxicólico (AQDC<sup>2</sup>) es capaz de reducir la saturación biliar de colesterol y disolver los cálculos cuando éstos son menores a 15 mm, proceso que tarda aproximadamente 6 meses. La dosis que suele ser usada consta de 13 a 15 mg por kg de peso. Los pacientes obesos requieren de dosis superiores, hasta 18 a 20 mg por kg. El tratamiento de mantenimiento de AQDC es de 375 mg/día, es ineficaz para evitar las recidivas (Soffer, 2000, pág. 140).

Así mismo, Soffer (2000) señala que el ácido ursodesoxicólico (AUDC), reduce la saturación de colesterol de la bilis al inhibir la enzima hepática hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCoAR). Por otra parte, hay estudios que proponen que el efecto es a través de la fosfolipasa-A2, molécula de bajo peso molecular que tiene un papel importante en la inflamación de la mucosa mediante la producción de proteínas precipitantes en la bilis y, con ello, favorece la formación de cálculo. El AUDC disminuye los niveles de dichas proteínas y ejerce un efecto protector de membrana en la pared de la vesícula. Las indicaciones de su uso son las mismas que con el AQDC. Su dosis es de 8 a 10 mg por kg de peso administrado en una sola toma al acostarse cuando disminuye el flujo biliar (pág. 141).

---

<sup>2</sup>En esta investigación, se señala al ácido quenodesoxicólico como AQDC y al ácido ursodesoxicólico como AUDC.

## 1.7.Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía es un proceso separativo que se basa en repartir sustancias entre dos fases en forma multiplicativa. Una de las fases está inmóvil (fase estacionaria) y la otra se mueve (fase móvil). Durante la separación, la fase estacionaria (sólido adsorbente) es atravesada por la fase móvil (gas insoluble o líquido inmiscible en la fase estacionaria) (Arcilla & Fernández, 2008, pág. 17).

La clasificación de los procedimientos cromatográficos se realiza siguiendo distintos principios:

- Clasificación según la constitución física del soporte:
  - Cromatografía en papel.
  - Cromatografía en capa fina.
  - Cromatografía en columna.
  - Cromatografía gaseosa.
- Clasificación según la combinación de los distintos tipos de fase:
  - Cromatografía líquido-líquido.
  - Cromatografía gas-líquido.
  - Cromatografía gas-sólido.
  - Cromatografía líquido-sólido.
- Clasificación de acuerdo con el tipo de separación:
  - Cromatografía de reparto, pertenecen aquí la cromatografía líquido-líquido, cromatografía gas-líquido y algunas variantes específicas de la cromatografía en gel.
  - Cromatografía de adsorción, pertenecen aquí las gas-sólido, líquido-sólido y algunas variantes específicas de la cromatografía iónica (Arcilla & Fernández, 2008, pág. 18).

### **1.7.1. Cromatografía en Capa Fina (CCP)**

Arcilla & Fernández (2008) indican que la cromatografía en capa delgada, conocida como TLC (Thin-Layer Chromatography) es un procedimiento para separar mezclas de sustancias, identificando, caracterizando o determinando semi-cuantitativamente los componentes individuales. La separación se basa en que las sustancias del analito se repartan de modo diferencial entre 2 fases: estacionaria y móvil (pág. 14).

Estos mismos autores mencionan las características de la cromatografía en capa fina: la fase estacionaria es atravesada por una fase móvil que transporta los componentes individuales de una mezcla, en donde el recorrido particular de cada sustancia (Valor Rf: rango de referencia) depende de su solubilidad y/o de su comportamiento frente a la adsorción. Las separaciones se realizan por el procedimiento ascendente, introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente, que será succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de la placa.

Al elegir un adsorbente, el tamaño de sus partículas es el principal aspecto a tener en cuenta, pues cuanto más finamente este dividido, mayor será su adhesión al soporte.

#### **1.7.1.1. Sílica gel y alúmina**

Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, como sulfato de calcio semi-hidratado (yeso) para proporcionar firmeza al adsorbente. También pueden ser incorporados dos indicadores del ultravioleta, juntos o por separado (amarillo y verde), en diversos tipos de gel de sílice.

#### **1.7.1.2. Reveladores**

Se clasifican en destructivos y no destructivos. En el método destructivo el revelador reacciona con el componente a visualizar para dar una mancha coloreada, sin embargo

destruye por completo el analito, a diferencia del método no destructivo, que consiste en la revelación de las manchas pero sin destruir el componente a observar.

- Yodo: es un revelador universal que forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tonos amarillo-marrones), pero las manchas desaparecen con el tiempo, siendo así un revelador no destructivo.
- Ácido fosfomolibdico: es un ácido basado en complejos de fósforo y molibdeno. Se presenta como un sólido amarillo-naranja inodoro a temperatura ambiente. Es utilizado para revelar compuestos terpénicos produciendo manchas oscuras.

### **1.8. Resonancia Magnética Nuclear**

La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno. Debido a que los electrones producen modificaciones en los núcleos, débiles pero observables, efectos electrónicos que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, se puede estudiar detalladamente la estructura electrónica de las moléculas, razón del éxito de la RMN en química orgánica (Elguero *et al*, 2006, pág. 5).

Cuando se sitúa un núcleo en un campo magnético tiene lugar una interacción entre el momento magnético del núcleo y el campo, resultando en un desdoblamiento energético. Mediante la absorción y emisión de fotones electromagnéticos con la frecuencia adecuada pueden producirse transiciones entre esos nuevos estados energéticos. Los momentos magnéticos de los núcleos no solo interaccionan con el campo magnético aplicado sino también con los momentos magnéticos de los otros núcleos magnéticos y con los electrones (Larraona & Manjavacas, 2008, pág. 10).

Como consecuencia de este proceso, el espectro obtenido de la RMN refleja el entorno magnético de los núcleos, revelando la estructura del material al que pertenecen.



## **1.9. Actinomicetos**

Los actinomicetos están presentes en todo tipo de suelos tanto en las capas más superficiales como en horizontes profundos disminuyendo su concentración con la profundidad.

Suele ser el segundo grupo de microorganismos más abundante, después de las bacterias. Los Actinomicetos utilizan como fuente de carbono compuestos simples y complejos tales como ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Muchos pueden degradar proteínas, lípidos, almidón y quitina. Estos microorganismos participan en muchos procesos, tales como la descomposición de los compuestos más resistentes procedentes de plantas y animales, formación de humus, fermentación del compost, causantes de fitopatologías, infecciones en animales y en humanos y simbiosis con plantas (Soler, 2012, pág. 1).

### **1.9.1. Características de los actinomicetos**

Los actinomicetos forman un grupo de microorganismos morfológicamente muy heterogéneo. Muchos de ellos forman filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales. Su diversidad morfológica es considerable, desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas. Dos de las propiedades más significativas de los actinomicetos son su capacidad para desarrollarse sobre sustratos muy diversos que no pueden ser usados por otros microorganismos, como la quitina y celulosa y su aptitud para sintetizar numerosos metabolitos bioactivos. Estas propiedades ponen de manifiesto la riqueza del metabolismo celular de este grupo microbiano (Hernández, 2008, pág. 9).

El taxón incluye géneros con morfologías diferentes. Así, se pueden encontrar organismos que forman micelio ramificado y bien diferenciado como es el caso del género *Streptomyces*, otros poseen hifas que pueden fragmentar, como es el caso del género *Nocardia* o el género *Rhodococcus*; además varios géneros como *Gordonia* y *Mycobacterium* poseen formas cocáceas o cocobacilares.

Las cepas del género *Streptomyces* son unas de las de mayor importancia para la obtención de sustancias de interés biológico como antibióticos, antifúngicos y antitumorales (Leiva, 2006, pág. 7).

La mayoría de los Actinomicetos son mesófilos, su crecimiento registra entre 25°C a 30°C, en temperaturas superiores a 55°C solo algunas especies termofílicas de *Streptomyces sp.* *Thermonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.* son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura puede ser letal (Hernández, 2008, pág. 9).

### **1.9.2. Géneros de actinomicetos**

Hernández (2008) menciona algunas características de los principales géneros de Actinomicetos.

- ***Streptomyces***

El género *Streptomyces* es uno de los géneros más conocidos de los actinomicetos. Poseen una morfología particular, donde se diferencian dos formas de crecimiento, una primaria o asimilatoria y una secundaria o reproductiva. Las esporas reproductivas asexuales de *Streptomyces* se forman en los extremos de los filamentos aéreos. Si cada espora se deposita en un sustrato adecuado, puede germinar y formar una colonia nueva. Son aerobios estrictos. Suelen producir enzimas extracelulares que les permiten utilizar las proteínas, polisacáridos como el almidón, la celulosa y diversas materias orgánicas halladas en el suelo. El género es de gran importancia biotecnológica debido a que produce metabolitos secundarios como los antibióticos, que son de amplio uso en medicina humana y veterinaria, así como compuestos represores de tumores, enzimas y vitaminas.

- ***Nocardia***

*Nocardia* es un género de individuos gram positivos los cuales pueden ser encontrados en suelos ricos de materia orgánica, así como en aguas o materia orgánica en descomposición. Son poco frecuentes en zonas templadas o frías y son muy

característicos de zonas templadas. Ciertas especies de *Nocardias* tienen gran importancia clínica como agentes patógenos para el hombre y los animales. Forman filamentos y ramificaciones muy desarrolladas. Poseen micelio vegetativo que se fragmenta en elementos bacilares y cocoides. Los filamentos profundos se separan y tomar forma de rosario, en cambio los filamentos aéreos al fragmentarse produce células similares a esporas unicelulares que se dispersan y forman aerosoles. Estos microorganismos pueden reconocerse en el laboratorio por la formación, ya sea de colonias lisas, duras, adherentes o secas que se desarrollan después de tres días a dos semanas de incubación.

- ***Thermonospora***

La *Thermonospora* se caracteriza por ser altamente sensible al calor, las esporas de dicho microorganismo, puede ser sésil pero usualmente se forman esporófos ramificados; en muchas cepas la repetición de esporófos ramificados conlleva a la formación de agrupaciones de esporas, estas también son producidas en las hifas. La producción y esporulación del micelio aéreo generalmente es óptimo a pH mayor a 8. Un amplio rango de compuestos, incluyendo sustratos poliméricos, puede ser usado como fuente de carbono y energía. La habilidad de las *Thermonosporaceae* de secretar una variedad termoestable de enzimas extracelulares, les permite establecerse como la población dominante del compostaje a altas temperaturas de residuos vegetales y otros desperdicios.

### **1.9.3. Aplicaciones**

#### **1.9.3.1. Ambientales**

Algunos actinomicetos han sido descritos como agentes de biocontrol debido a su capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidases y otras. Entre este grupo se encuentran los *Streptomyces* por ser capaces de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, como *Alternaria sp.*, *Botrytis cinerea* y

*Rhizoctoniasolani*. Los *Streptomyces* también son importantes a la hora de promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, contribuyendo indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal (Salazar & Ordoñez, 2013, pág.34).

### **1.9.3.2. Industriales**

Varios antibióticos se derivan de actinomicetos marinos y en la actualidad, dos tercios de los antibióticos naturales se obtienen de varios géneros de actinomicetos y su uso sirve como fuente alternativa de sustancias biológicamente activas. Los antibióticos producidos por estos microorganismos son muy eficientes en la lucha contra las infecciones microbianas, debido a su resistencia contra otros microorganismos patógenos. Actualmente se cuenta con más de 10000 productos aislados tan solo del orden de los *Actinomicetales* (Vimal et al, 2009, pág. 1)

## **1.10. Biotecnología**

### **1.10.1. Aspectos Generales**

Según Marín et al (2005) dentro de las distintas metodologías aplicables a resolver problemas de contaminación o desarrollar tecnologías productivas alternativas, la biología ocupa un lugar predominante debido a la diversidad metabólica y funcional de los distintos seres vivos en la eliminación de residuos, por esta razón su uso en procesos biotecnológicos es una auténtica revolución (pág. 29).

A la biotecnología como tal se le atribuye un listado de implicaciones ambientales en las que toma parte: biolixiviación controlada de sulfuros metálicos, la biodesulfuración de carbones previo a su combustión, la descontaminación de suelos con elevados contenidos en metales pesados mediante la utilización de plantas bioacumuladoras, la producción de plásticos biodegradables, la producción de bioalcoholes como sustituto a

los combustibles fósiles, la producción de materias primas de interés químico por métodos biológicos, el control de patógenos en el medio ambiente utilizando técnicas de ecología molecular o la utilización de microorganismos para degradar compuestos recalcitrantes y, esto solo por mencionar algunos ejemplos. (Marín *et al*, 2005, pág. 29).

El interés actual de la biotecnología reside en el potencial que supone la unión de procesos y métodos biológicos, antiguos y nuevos, con las técnicas de la ingeniería química y la electrónica. De una forma gráfica, se puede representar la biotecnología moderna como un árbol que tiene por raíces las ciencias biológicas (microbiología, genética, biología molecular, bioquímica) y cuyas ramas son la ingeniería química de procesos en su acepción más amplia (CARPL, 2003, pág. 6).

### **1.10.2. Biotecnología en Ecuador**

Nuestro país presenta unos rasgos ecológicos propios de un universo pequeño, su diversidad cultural, étnica, flora y fauna, topografía, suelos, variados climas, maravillosos paisajes naturales, hacen del Ecuador un sistema ecológico dinámico de considerables variaciones (Meza, 2002, pág. 4).

El Ecuador es una de las 17 regiones de mayor mega diversidad en el mundo, que de ser investigada científicamente, puede constituirse en una fuente de innumerables descubiertas de nuevos agentes biológicos, microorganismos y sustancias con aplicaciones médicas, alimentarias e industriales.

Por otro lado, el mercado consumidor interno del Ecuador está demandando cada vez más productos y servicios de biotecnología avanzada, principalmente para su aplicación en la agropecuaria, biorremediación, cuidado de la salud, producción de alimentos y biocombustibles (ProEcuador, 2013, pág. 5).

La biotecnología es uno de los sectores priorizados en el cambio de la matriz productiva del Gobierno que está realizando importantes inversiones para el desarrollo del sector.

La industria de la biotecnología en Ecuador se ha concentrado en actividades de investigación y provisión de servicios. Las ramas más desarrolladas son la agrobiotecnología y biorremediación. Pero también hay avances prometedores en la biotecnología médica aplicada al cuidado de la salud, prevención y control de enfermedades humanas, así como al ambiente y conservación.

La mayor parte de los laboratorios biotecnológicos en Ecuador ejecutan actividades que tienen aplicaciones agrícolas (36%) seguidas de ambiente y conservación (23%), salud (18%) y biorremediación (11%) (ProEcuador, 2013, pág. 14).

Las capacidades técnico-científicas y aplicaciones en el país han presentado un interesante nivel de desarrollo en la última década principalmente en el área de la biotecnología verde o agrobiotecnología; sin embargo el trabajo en esta materia en el Ecuador tiene mucho camino por recorrer tanto desde la decisión política de apoyo a la biotecnología como con la articulación público-privada en temas de desarrollo biotecnológico.

### **1.10.3. Biotransformación**

Como parte de la biotecnología blanca se trata de explotar la capacidad de los microorganismos para transformar un sustrato de partida en un producto de interés industrial. Es necesario hacer algunas distinciones entre los diversos tipos de modificaciones a las que un sustrato puede ser sometido. En particular, hay que distinguir entre bioconversión, biodegradación y biotransformación. Las dos primeras proporcionan una síntesis de *novo* de los productos relativamente complejos catalizados por células, tejidos, órganos o microorganismos, a partir de compuestos estructuralmente muy simples, tales como dióxido de carbono, amoníaco o glucosa. La biodegradación consiste en procesos catabólicos que tienden a llevar las sustancias orgánicas a las sustancias inorgánicas.

La biotransformación es el proceso en el que, un biocatalizador (microorganismo o enzima purificada) es utilizado para la modificación de los procesos que se llevan a cabo

en el metabolismo secundario de un organismo. Esta segunda opción es muy atractiva desde el punto de vista industrial (Maldonado, 2013, pág.27).

### **1.11. Identificación de microorganismos**

Durante mucho tiempo la identificación de microorganismos que forman parte de un ecosistema ha dependido de la obtención de cultivos puros mediante la utilización de técnicas de aislamiento y purificación. Para aislar microorganismos es necesario conocer al menos parcialmente, sus necesidades fisiológicas. Por este motivo, aquellos organismos de los que no sabemos nada, no van a resultar fáciles de aislar y por lo tanto jamás se podrá conocer a que comunidad bacteriana pertenecen. En gran medida este problema se ha visto solucionado aplicando conocimientos de genéticas y de técnicas de biología molecular a la ecología convencional. De este modo es posible caracterizar los microorganismos que componen un sistema al nivel del ADN, sin necesidad de cultivarlos previamente (Marín et al, 2005, pág. 31).

Existen diferentes maneras de identificar y caracterizar una cepa microbiana. Muchas investigaciones se valen de las pruebas bioquímicas para determinar la cepa con la que se trabaja. Sin embargo, cuando estas pruebas no proporcionan datos aceptables, la caracterización fenotípica y genotípica constituyen herramientas muy útiles.

#### **1.11.1. Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas se basan en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma microbiano. Estas enzimas (catalasas, coagulasas, decarboxilasas, deaminasas, ureasas, peroxidases, etc) involucradas en el metabolismo de cada microorganismo y pueden ser evidenciadas en medios de cultivo especiales que contienen los substratos sobre los cuales ellas actúan, junto con un sistema indicador que pone en manifiesto la degradación del substrato o la presencia de un metabolito específico (ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico, etc.).

Las pruebas bioquímicas también evalúan la capacidad de reducir ciertos iones (ferroso a férrico), la presencia o ausencia de flagelos (prueba de movilidad), la producción o no de hemolisinas, el requerimiento o no de algunos factores especiales (proteínas séricas), la producción o no de algunas toxinas con capacidad virulenta (Murcia, 2008, pág. 1).

Las pruebas Microgen™ Gn A+B – ID System emplean 24 sustratos bioquímicos deshidratados y estandarizados en pocillos para identificar la familia *Enterobacteriaceae* y otros microorganismos no exigentes (Manual Microgen, 2013, pág. 2). Los 24 sustratos son reconstituídos con una solución salina de los microorganismos para ser identificados. Si los sustratos individuales son metabolizados por el organismo, ocurre un cambio de color durante la incubación y después de la adición de los reactivos específicos. La permutación de los sustratos metabolizados puede ser interpretada utilizando el Software de Identificación del Sistema Microgen y así identificar el microorganismo de prueba.

### **1.11.2. Caracterización fenotípica de microorganismos**

Las pruebas fenotípicas convencionales que se suelen utilizar se basan en la observación de las características morfológicas macroscópicas de las colonias en los diferentes medios de cultivo, observación de morfología microscópica con las tinciones de Gram y la descomposición de algunos sustratos específicos, tales como adenina, xantina, caseína, hipoxantina, testosterona, tirosina y urea entre otros (Soler 2012, pág. 29).

#### **1.11.2.1. Fundamento de la tinción de Gram**

La tinción es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico.

La tinción de Gram se denomina así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de gram, las bacterias



pueden dividirse en dos grupos, gram positivas y gram negativas, éstas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. Santambrosio (2009) menciona que la pared de la célula gram positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano, generalmente el 80% - 90% de la pared de la célula gram positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram negativa es peptidoglicano (pág. 2).

La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el cristal violeta que se utiliza en la tinción. Las células gram positivas, a causa de sus paredes celulares más espesas, no son permeables al disolvente aplicado, provocando que el cristal violeta quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células gram positivas son todavía azules, pero las gram negativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen azules (Santambrosio, 2009, pág. 3).

#### **1.11.2.2. Cinética de Crecimiento Microbiano**

La fisión binaria y otros procesos de división celular causan un aumento en el número de células de una población. El crecimiento poblacional es estudiado mediante el análisis de la curva de crecimiento de un cultivo microbiano. Cuando se cultivan microorganismos en medio líquido, suele hacerse en un cultivo discontinuo o sistema cerrado, es decir, los microorganismos son incubados en un recipiente cerrado al que no se añade más cantidad de medio que la inicial. Por lo tanto, las concentraciones de nutrientes disminuyen progresivamente mientras que las concentraciones de residuos aumentan. El crecimiento de microorganismos que se reproducen mediante fisión binaria puede representarse gráficamente como en logaritmo del número de células viables frente al

tiempo de incubación. La curva resultante presenta distintas fases. Sherwood y Woolverton (2009) indican las fases del crecimiento microbiano, las cuales conforman la curva de crecimiento. Estas son:

- a) Fase de latencia: cuando se introducen los microorganismos en un medio de cultivo fresco, generalmente no se produce un aumento inmediato del número de células. Este periodo inicial se llama fase de latencia. Esta fase puede ser necesaria debido a varias razones. Quizá las células están envejecidas y carecen de una provisión suficiente de ATP, cofactores y demás componentes los que, deben ser sintetizados antes de comenzar el crecimiento. Además, el medio de cultivo puede ser diferente de aquel en el que el microorganismo estaba creciendo anteriormente, por lo que la síntesis de enzimas debe darse antes del crecimiento celular.
- b) Fase Exponencial: durante esta fase (también llamada logarítmica) los microorganismos crecen y se dividen a la velocidad máxima posible que les permite su potencial genético, naturaleza del medio y condiciones de cultivo. La velocidad de crecimiento es constante durante toda la fase exponencial; es decir, los microorganismos se dividen y su número duplica a intervalos regulares.
- c) Fase Estacionaria: en un sistema cerrado llega un momento en el que el crecimiento de la población se detiene y la curva de crecimiento se hace horizontal. Los cultivos bacterianos suelen alcanzar la fase estacionaria cuando la población asciende a unas  $10^9$  células por mililitro. En general, otros microorganismos no alcanzan tan elevadas concentraciones; por ejemplo, los cultivos de protistas suelen tener concentraciones máximas de unas  $10^6$  células por mililitros. Un factor obvio para entrar a esta fase es la limitación de nutrientes; si la concentración de un nutriente esencial disminuye gravemente, el crecimiento de la población disminuirá.
- d) Senescencia y muerte: es la fase donde las células dejan de reproducirse por lo que el crecimiento se detiene. Existen dos tipos de alternativas para esta fase; algunos microbiólogos creen que la disminución exponencial de la densidad en la fase de muerte no significa que las células hayan perdido irreversiblemente su capacidad de reproducirse. En este punto se dice que las células son viables pero no cultivables. La segunda alternativa a una fase de muerte es la muerte celular programada, donde una fracción de la población microbiana está genéticamente programada para

suicidarse; células se sacrifican por la población para que las demás células que aún no han empezado a sacrificarse consuman los nutrientes que aún sobran en el medio (págs. 213-214).

### **1.11.2.3. Medida del crecimiento microbiano**

Puede emplearse la espectrofotometría para medir la masa celular. Este método es más rápido y sensible que el anterior y se basa en la disposición de la luz por parte de las células microbianas. Como todas las células microbianas de una población tienen un tamaño parecido, la intensidad de la dispersión es directamente proporcional a la biomasa de células presentes y está indirectamente relacionada con el número de células. Cuando la concentración de células alcanza unos 10 millones de células por mililitro, el medio aparece ligeramente turbio. Un aumento de la concentración produce una mayor turbidez y se transmite menos luz a través del medio. La intensidad de la dispersión de la luz puede medirse con un espectrofotómetro y está relacionada casi linealmente con la concentración celular, a niveles bajos de absorbancia. Así puede medirse fácilmente el crecimiento de la población, mientras esta sea suficiente para producir una turbidez detectable (Sherwood y Woolverton, 2009, pág. 215).

### **1.11.3. Caracterización genotípica**

Desde que fue posible utilizar técnicas genéticas para la identificación de un individuo, su uso se expandió por todo el mundo y los resultados obtenidos son más específicos y confiables.

#### **1.11.3.1. Extracción de ADN**

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación

de ADN. Los métodos de extracción de ADN han permitido obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis. Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados (Somma, 2009, pág. 2).

Dada la gran variedad de métodos de extracción y purificación de ácidos nucleicos existentes, la elección de la técnica más adecuada se hace conforme a los criterios siguientes: • ácido nucleico diana; • organismo fuente; • material inicial (tejido, hoja, semilla, material transformado, etc.); • resultados deseados (rendimiento, pureza, tiempo que requiere la purificación); • uso posterior (PCR, clonación, etiquetado, transferencia, RT-PCR, síntesis de ADNc, etc.) (Somma, 2009, pág. 3).

### **1.11.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación in vivo del ADN: el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. Esta técnica consiste en ciclos repetitivos de: a) desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario; b) unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos, utilizados como cebadores, al ADN diana y c) extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones  $Mg^{2+}$ . Los oligonucleótidos consisten normalmente en secuencias relativamente cortas, que son diferentes entre sí y complementarias de los sitios de reconocimiento que flanquean el segmento de ADN diana que debe amplificarse. Las fases de desnaturalización del ADN molde, anillamiento del cebador y extensión del cebador constituyen un «ciclo» del método de amplificación por PCR (Somma, 2009, pág. 9).

Los elementos importantes en la PCR son el molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina,

timina, citosina y guanina), el ión magnesio ( $Mg^{2+}$ ) una solución amortiguadora o buffer y  $H_2O$ . Todos estos elementos interactúan en las tres etapas. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay et al, 2013, pág. 72).

### **1.11.3.3. Electroforesis**

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, dependiendo del tamaño de las moléculas, el gel puede ser de hasta el 2% de agarosa y se agrega bromuro de etidio ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ), una molécula capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón (Tamay et al, 2013, pág. 73).

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES, MÉTODOS Y REACTIVOS**

#### **2.1.FASE I: Muestreo**

Se seleccionaron las zonas de muestreo basándose en:

- Ubicación de la zona de muestreo: el lugar de muestreo debe estar próxima al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad, de este modo, se permite la conservación del material muestreado hasta ser trasladado a los laboratorios donde se realizará su análisis.
- Asepsia del lugar: la prevalencia de desechos de faenamiento en una zona determinada permitirá encontrar microorganismos con capacidad de biotransformar ácidos biliares.
- Accesibilidad: la zona de muestreo debe ser accesible para aplicar las diferentes técnicas de muestreo que serán aplicadas.

##### **2.1.1. Delimitación de la zona de muestreo**

El muestreo se realizó en las provincias de Pichincha y Morona Santiago. La ubicación de las localidades de cada provincia se describe en las siguientes tablas.

###### **2.1.1.1.Provincia de Morona Santiago**

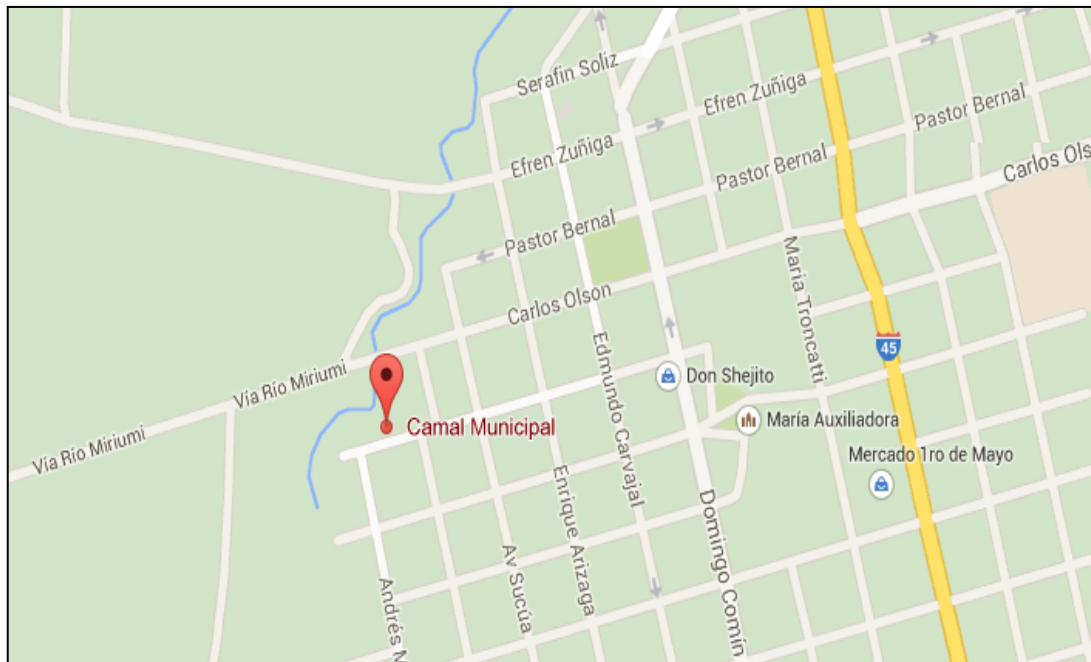
**Tabla 1. Ubicación de la localidad Camal de Sucúa.**

LOCALIDAD	UBICACIÓN
<b>Camal de Sucúa</b>	<p>Establecimiento de faenamiento de reses. Está ubicado al sur occidente de la ciudad de Macas, entre la Av. Sucúa y Kiruba.</p> <p><b>Coordenadas Geográficas:</b> Latitud (x): -2,47 Longitud (y): -78.17</p>

**Nota:** Coordenadas de la ubicación del Camal de Sucúa.

**Fuente:** elaborado por Beltrán, 2015.

**Ubicación del Camal de Sucúa**



**Figura 8. Ubicación del Camal de Sucúa en el mapa.**

**Fuente:** Google Maps

## 2.1.1.2. Provincia de Pichincha

Tabla 2. Ubicación de la localidad río Machángara.

LOCALIDAD	UBICACIÓN
<b>Río Machángara – Sector Quitumbe</b>	Sector seleccionado: ribera del río localizada al sur de la ciudad de Quito, en el sector de Quitumbe, junto al Parque “Las Cuadras”.  <b>Coordenadas Geográficas:</b> Latitud (x): -0,28 Longitud (y): -78,54

Nota: Coordenadas de la ubicación del Río Machángara.

Fuente: elaborado por Beltrán, 2015.

Ubicación del Río Machángara

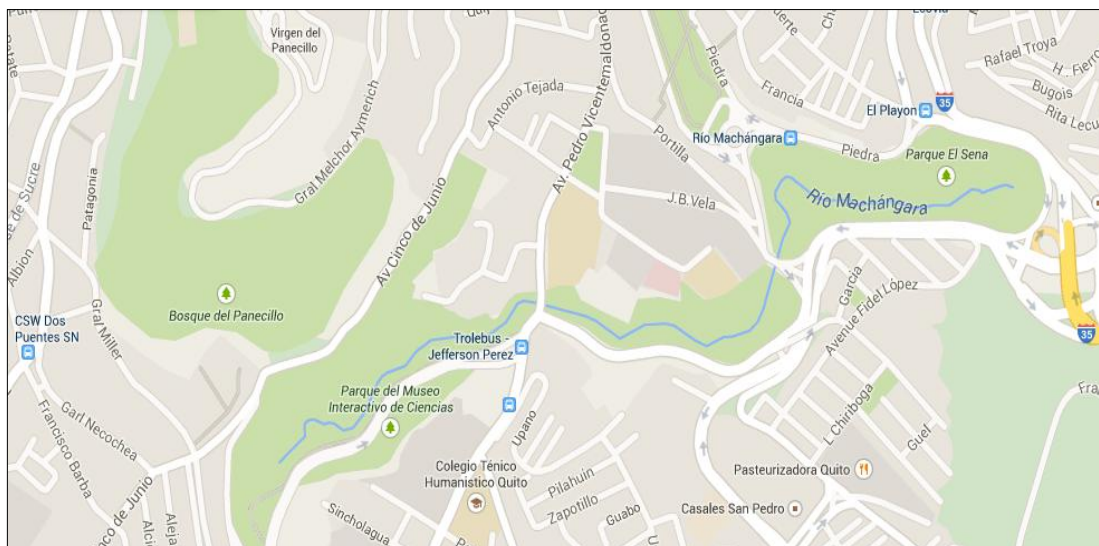


Figura 9. Ubicación del Río Machángara en el mapa.

Fuente: Google Maps



### 2.1.2. Selección de áreas específicas de muestreo

**Camal de Sucúa:** se seleccionaron las áreas de acumulación de los líquidos residuales, producto del faenamiento de reses: canales de desagüe, depósitos de agua residual, depósitos de cabezas, patas y piel, frascos conteniendo partes de estómagos de reses, así como de mesones, pisos e instrumentos para el faenamiento.

**Río Machángara:** a orillas del río en el Sector de Quitumbe se seleccionó una zona del río con alto nivel de contaminación (se observó que el agua de esa zona era turbia y circulaba basura alrededor. Se delimitó 1m<sup>2</sup> de superficie de río para tomar muestras.

En la siguiente tabla se resumen las zonas específicas de muestreo de ambas zonas.

**Tabla 3. Áreas específicas de muestreo.**

Zona de Muestreo	Descripción del área de Muestreo
<b>Machángara - Entrada al parque</b>	Pocillo de agua estancada
	Zona fangosa
	Creciente de la turbulencia del río
<b>Machángara - Salida del parque</b>	Fuente de agua estancada contaminada
	Corriente situada antes de su entrada en la ciudad
<b>Camal Sucúa</b>	Vertedero de aguas procedentes de la depuración del intestino
	Pozo de agua con contenido del agua de lavado
	Superficie del lavado y recolección de intestinos
	Área de procesamiento del animal
	Superficie del lavado y recolección de intestinos
	Vertedero de aguas procedentes de la depuración del sacrificio animal

**Nota: Determinación de zonas específicas de muestreo.**

**Fuente: elaborado por Beltrán, 2015.**

### **2.1.3. Materiales y métodos para el muestreo**

**Muestreo en el Camal de Sucúa:** se esterilizaron tubos de ensayo con 5ml de solución fisiológica y un hisopo. Para el muestreo se utiliza el hisopo de cada tubo y se pasa por cada superficie considerada de acuerdo al numeral 2.1. Se vuelve a colocar el hisopo dentro de su respectivo frasco hasta que la solución fisiológica lo cubra completamente. En caso de residuos líquidos se tomaron muestras con pipetas estériles y se colocaron en tubos de ensayo estériles. Todas las muestras fueron almacenadas en cooler a una temperatura de 4°C para ser transportadas al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad de la Universidad Politécnica Salesiana dentro de las 24 horas posteriores al muestreo.

**Muestreo en la ribera del río Machángara:** se recogieron muestras de agua con tubos de ensayo a una profundidad de 15cm desde la superficie del río aplicando las buenas prácticas de laboratorio. Las muestras fueron trasladadas al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad de la Universidad Politécnica Salesiana en cooler a una temperatura de 4°C dentro de las 24 horas posteriores al muestreo.

## **2.2.FASE II. Aislamiento y purificación**

La fase de aislamiento es necesaria para obtener un banco de cepas puras con las que se trabajará.

### **2.2.1. Preparación de diluciones**

A partir de las muestras (contenidas en tubos de ensayo) se prepararon diluciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$  de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se prepararon 10 tubos de ensayo estériles con 9ml agua destilada para realizar las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$ .

- En condiciones de esterilidad, se colocó 1ml de muestra en el primer tubo. De éste se tomó nuevamente 1ml y se traspasó al siguiente tubo. Se agitó y se continuó hasta llegar al tubo que contendrá la dilución  $10^{-10}$ .
- Las diluciones que se utilizaron fueron  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  ya que ya que en éstas se obtienen colonias aisladas de los actinomicetos.
- El mismo procedimiento se realizó para todas las muestras.

### 2.2.2. Cultivo en medio sólido

DB DIFCO Columbia Agar Base: se preparó el medio de acuerdo a las indicaciones del fabricante que se muestran en las siguientes tablas:

**Tabla 4. Ficha técnica Columbia Agar.**

Compuesto	Cantidad
Digerido pancreático de caseína	12 g
Digerido peptídico de tejido animal	5 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de carne	3 g
Almidón	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	13.5 g
Fórmula aproximada por litro de preparación	

**Nota: Componentes de Agar Columbia para 1 litro.**

**Fuente: (Interlab. Distribuidora de productos científicos, 2015)**

El procedimiento para preparar Columbia Agar es el siguiente:

**Tabla 5. Indicaciones para la preparación del producto deshidratado.**

Suspender 42.5 g del polvo en 1 litro de agua purificada.
Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para la disolución completa del polvo.
Autoclavar a 121°C durante 15 minutos a 1 atm.
Dejar enfriar hasta 45°C para su uso.

**Nota: Preparación de Agar Columbia.**

**Fuente: (Interlab. Distribuidora de productos científicos, 2015).**

Para la selectividad del medio, se adicionó un complejo antibiótico para el crecimiento exclusivo de actinomicetos denominado ACTINOMYCETE SELECTATAB™. Es un complejo compuesto por metronidazole y ácido nalidíxico.

En cámara de flujo laminar, se colocaron 20 ml del medio en cajas Petri y se dejó enfriar para la solidificación del medio y su uso posterior. Se tomó 1ml de dilución (como se mencionó anteriormente se utilizan las diluciones  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$ ) y se sembró en la caja mediante el método de dispersión en el que, se coloca 1 ml de dilución en el medio y, con una espátula de Drigalsky, se extiende el inóculo hasta cubrir toda la superficie de la caja. Se codificó cada caja dependiendo la procedencia de la muestra que se utilizó. Una vez concluida la siembra, se incubaron las cajas a 29°C durante 24 horas y se observó el crecimiento en cada una.

Se aislaron y purificaron las cepas que crecieron en cada caja. Primero se designó un código a cada cepa observada en las cajas madre de acuerdo al siguiente criterio:

Ej: MMAE-5

- MM corresponde a María Maldonado
- A corresponde a Actinomicetos
- E corresponde a Ecuador
- 5: corresponde al número de colonia identificada

Con un asa de siembra de nicromo se tomó una pequeña cantidad una unidad formadora de colonias (UFC) y se inoculó en una nueva caja Petri. Se procedió de la misma manera con cada cepa identificada. Se incubaron todas las cajas a 29°C durante 24 horas.

Si se observa que el crecimiento corresponde a una sola cepa, se determina que esta cepa es pura; se le designa un código final (por ejemplo MMAE-17A) y se la almacena en refrigeración a 4°C hasta que se requiera su uso.

Para que la conservación de las cepas sea mejor, se inoculara cada cepa pura en tubos pico de flauta con 15ml de medio Columbia Agar, se incuban los tubos a 29°C por 24 - 48 horas y una vez se observe el crecimiento, se las mantiene en refrigeración a 4°C.

### **2.3.FASE III. Screening microbiológico**

Es conveniente dividir a la fase de Screening en 3 sub-fases: cultivo en medio líquido denominado ATT (abreviatura para Actinomicetos), siembra de la sal sódica del ácido desoxicólico en medio líquido y cromatografía en Capa Fina (CCP).

#### **2.3.1. Cultivo en medio líquido ATT**

El medio líquido que se utilizó para el crecimiento de actinomicetos está diseñado para satisfacer los requerimientos de estos microorganismos. Para su preparación se utilizan los componentes enlistados en la siguiente tabla:

**Tabla 6: Componentes del medio líquido ATT.**

Componente	Cantidad
Triptona	8 mg
Peptona – caseína	10 mg
NaCl	0.5 mg
Extracto de Carne	5mg
Almidón	1mg
Agua destilada	Cantidad suficiente para 1 litro.

**Nota: Componentes de medio ATT para 1 litro.**

**Fuente: elaborado por Beltrán, 2015.**

Se mezclaron los componentes, cuyas cantidades están de acuerdo a la cantidad de medio que se desee preparar. Se calentó y se llevó a ebullición durante 1 minuto. Se colocaron 20 ml del medio en Erlenmeyers de 100 ml y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos a 1 atm.

En condiciones de esterilidad, se inoculó cada cepa en un Erlenmeyer al que se rotuló con el código de la cepa que se le ha destinado. Al inocular cada cepa, se colocaron los frascos en una incubadora con agitación a 29°C.

### **2.3.2. Siembra de la sal sódica del ácido desoxicólico**

Después de 24 horas de incubación, se inocularon 400 µl una solución de sal sódica de ácido desoxicólico con una concentración de 20 ppm. Una vez colocada la sal, los frascos se colocaron en agitación a 29°C durante 24 horas, tiempo en el que se realizó la primera corrida cromatográfica.

### **2.3.3. Preparación de la muestra para el análisis por CCF**

Luego de 24 horas de colocar la sal en el medio, se tomaron 350 µl de medio de cada Erlenmeyer para realizar el análisis por cromatografía en capa fina (CCP). En tubos Eppendorf de 1 ml se colocaron los 350 µl de medio, 300 µl de acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ) y 100µl de ácido clorhídrico (HCl) 1M. Se agitó en vórtex durante 30 segundos y se observó la formación de 2 fases. La fase que interesa es la fase de acetato de etilo.

Con un capilar de vidrio se tomó la fase de acetato de etilo de cada tubo Eppendorf y se sembró en placas cromatográficas de sílica de marca ANALTECH. Una vez colocadas todas las muestras (incluido el estándar de ácido desoxicólico) se colocó la placa en una cámara de cromatografía con la fase móvil. En el caso del ácido desoxicólico se utilizó una fase móvil compuesta de acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ), ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ) y ácido clorhídrico (HCl) 1 M en proporción 70:30:2 respectivamente. Una vez el solvente haya ascendido por la placa, se dejó secar en una sorbona.

Para revelar las manchas que se formaron en las placas cromatográficas se utilizó un revelador de ácido fosfomolibdico ( $H_3[P(Mo_3O_{10})_4] \cdot xH_2O$ ) basado en complejos de fósforo y molibdeno, que se prepara con etanol y ácido fosfomolibdico en polvo comercial. Con una bomba de vacío y un aspersor se cubrió totalmente la placa con el revelador hasta que ésta tomó un color verde-azulado. Se calentó la placa en una plancha de calentamiento a una temperatura no mayor a 100°C durante 3 minutos. Se observaron las manchas y se tomaron registros fotográficos de las placas. Es necesario realizar este mismo procedimiento cada 24 horas con las 53 cepas para que observar cómo avanza el proceso de biotransformación. Se detuvo el monitoreo de cada cepas a las 72 horas por lo que se realizaron 3 placas por cada cepa.

### **2.3.4. Escalamiento del cultivo.**

Una vez que se han analizado todas las cepas y se ha determinado aquellas que presentan mayor capacidad de biotransformación, se realizó un escalamiento del cultivo, en el que

se trabajó con un volumen de 200 ml. Se inoculó cada cepa en el volumen señalado y, una vez que se dio el crecimiento, se sembraron 4ml de una solución de 20 ppm de sal sódica del ácido desoxicólico. El monitoreo por CCP es igual para esta fase del Screening.

Se observó cuál de las cepas tuvo mayor capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico y se analizaron los compuestos generados mediante resonancia magnética nuclear.

## **2.4.FASE IV: Análisis mediante RNM**

### **2.4.1. Extracción del compuesto a identificar**

Cuando se seleccionó la cepa con mayor interés, se extrajeron los compuestos dispersos en el medio de cultivo, para su respectiva identificación mediante resonancia magnética nuclear. Para esto, se centrifugó el contenido de los Erlenmeyers en tubos Falcon a 5000 rpm durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un embudo de separación. Se añadió al embudo ácido clorhídrico (HCl) concentrado para acidificar el medio y acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ) con el fin de que, en presencia del ácido clorhídrico, la sal que está en el medio libere el ácido biliar, el mismo que se extrae con el acetato de etilo. De las dos fases que se forman, la que contiene los productos de la biotransformación es fase la de acetato de etilo. Se realizaron al menos tres extracciones, aplicando acetato de etilo, para recuperar todo el producto que sea posible.

Se tomaron las fases de acetato de etilo y se la colocaron en un frasco, al que se añadió sulfato de sodio anhidro ( $Na_2SO_4$ ) para eliminar las trazas de agua que hayan quedado en el medio. Se dejó reposar por 5 minutos y se filtró. El líquido resultante se colocó en un balón de 500 ml, el cual fue pesado antes de ser utilizado. Se eliminó todo el solvente con la ayuda de un rotavapor modelo IKA RV10 BASIC con una temperatura menor  $40^{\circ}C$  a 20 rpm.



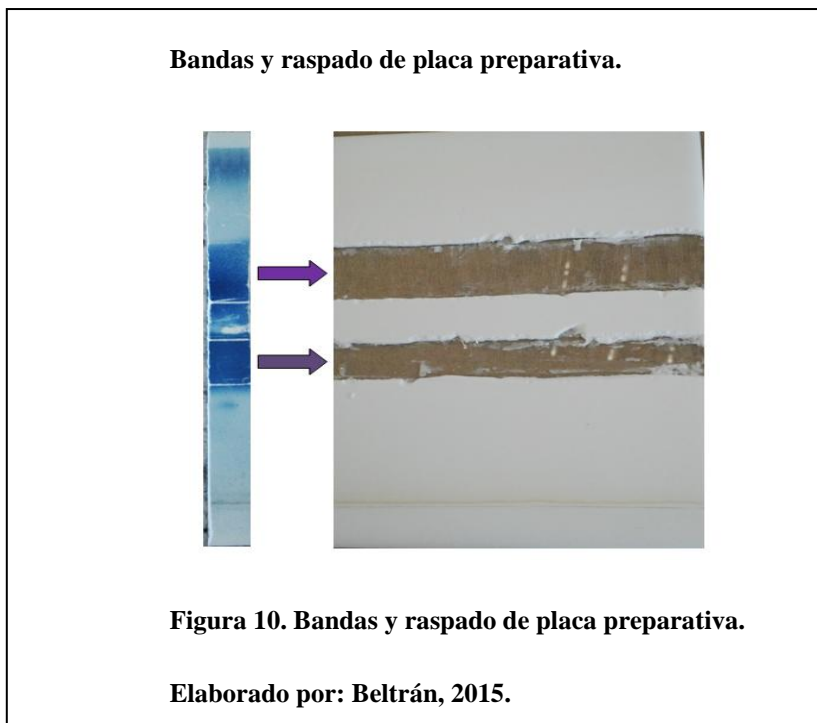
### 2.4.2. Placa Preparativa

Se diluyó el producto que quedó en el balón con 3 ml de acetato de etilo y, con una pipeta Pasteur se lo sembró a lo largo de la placa. Al ser una placa preparativa, el ancho de la banda de siembra es de aproximadamente 0,5 cm. Se dejó secar y la placa fue colocada en la cámara cromatográfica con la fase móvil de acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ), ácido clorhídrico (HCl) 1 M y ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ) en proporción 70:30:2, respectivamente. Cuando el solvente cubrió la placa, se retiró de la cámara cromatográfica y se secó con una secadora de cabello.

Con la placa totalmente seca, se cortaron 3cm desde el borde izquierdo de la misma. Esta porción fue rociada con el revelador de ácido fosfomolibdico y calentada en una plancha de calentamiento para observar las bandas que se forman.

Utilizando una espátula se raspó cada banda que se haya coloreado en la placa. Es importante el uso de mascarillas para evitar la inhalación del polvo de sílica, ya que es cancerígeno.

La siguiente figura muestra el raspado de la placa.



La sílica recuperada del raspado de cada banda fue colocada en un Erlenmeyer, al que se añadieron 5 ml de acetato de etilo. Se dejó en agitación durante 2 horas y, transcurrido este tiempo se filtró el Erlenmeyer. El etil acetato filtrado fue colocado en un frasco de vidrio pesado antes de su uso. Esta muestra se roció con nitrógeno líquido para secarla totalmente y obtener el compuesto purificado. Se pesó finalmente el frasco de vidrio para determinar el peso del compuesto resultante y la eficacia de la técnica.

### **2.4.3. Identificación del compuesto**

Una vez obtenido y purificado el compuesto de interés, éste fue debidamente etiquetado y enviado a los laboratorios de la Universidad Técnica Particular de Loja para realizar la identificación mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros obtenidos se analizaron de acuerdo a la forma del espectro: número de picos, forma y tamaño del pico para la identificación del compuesto resultante.

## **2.5. Identificación de actinomicetos**

### **2.5.1. Tinción de Gram**

Debido a que los Actinomicetos pueden ser gram positivos o gram negativos, es conveniente realizar pruebas de tinción para determinar que comportamiento de gram presenta la cepa seleccionada.

Para esto, se tomó una pequeña cantidad de la cepa con ayuda de un asa de cultivo y se coloca en un porta objetos. Se coloca una gota de solución salina sobre la muestra y se fija al porta objetos con un mechero. Una vez fija la cepa, el procedimiento para la tinción es el siguiente:

- 1) Se coloca una gota de cristal violeta sobre la muestra fija y se deja actuar durante 1 minuto.
- 2) Lavar la placa con agua para quitar el sobrante de cristal violeta.

- 3) Colocar cantidad suficiente de lugol (yodo de gram) para cubrir la muestra y deje actuar durante 1 minuto.
- 4) Lavar nuevamente con agua para eliminar el sobrante.
- 5) Aplicar alcohol-acetona para quitar el cristal violeta que no se ha fijado a las células.
- 6) Agregar safranina para la tinción de contraste.
- 7) Por último, lavar suavemente con agua, secar la preparación y examinar al microscopio con el objetivo 100X de inmersión de aceite.

### **2.5.2. Pruebas Bioquímicas.**

El Actinomiceto que presentó mayor capacidad de biotransformación fue identificado con pruebas bioquímicas mediante el sistema Microgen GEN-ID A+B, que utiliza 24 sustratos deshidratados, basado en la transformación de cada uno de dichos sustratos. En Ecuador y en el extranjero no se logró encontrar una kit específico para este grupo de microorganismos, por lo que fue conveniente realizar su caracterización fenotípica y genotípica.

### **2.5.3. Caracterización Fenotípica**

Se caracterizó la cepa de Actinomicetos en cuanto a su morfología y a su cinética de crecimiento.

- **Caracterización morfológica:** se observó la cepa en medio sólido en una caja Petri para la determinación de sus características morfoculturales: colonia, color, bordes, elevaciones, forma, etc. Además se midió las dimensiones celulares para comparar con la literatura internacional.
- **Medición de células:** se prepararon portaobjetos recubiertos con una película fina de Agar-Agua y se adicionaron una azada de células tomadas de cultivo de 7 días en crecimiento para medir 25 células con ayuda del microscopio óptico. Se realizaron mediciones en tres campos visuales para un total de 75 células. A los datos

obtenidos se les realizó análisis estadísticos mediante un ANOVA de clasificación simple, procesando las medias con diferencias significativas con el Test de Tukey a significación de 0,001 con ayuda del paquete estadístico Statistic 6.0.

– **Cinética de crecimiento:**

Para la obtención de la curva de crecimiento microbiano en función del tiempo se tomaron dos parámetros físicos: efecto de la temperatura y pH. Las mediciones se realizaron mediante un espectrofotómetro, aplicando la Ley de Lambert-Beer, para obtener la densidad óptica, realizando los siguientes pasos:

- Se colocó 200 ml de medio líquido ATT estéril en Erlenmeyer de 250 ml.
- Se inoculó la cepa correspondiente en cada uno de los frascos, replicando tres veces cada temperatura y pH.
- Cada Erlenmeyer se colocó a la temperatura asignada, efectuando cada 12 horas las correspondientes mediciones.
- Se tomó una alícuota de 2 ml, se colocó en celdas de vidrio y se midió la absorbancia.
- De la misma manera se procede con pH de 2, 3, 4, 5 y 6.
- Una vez medida la absorbancia de cada temperatura y pH, se anotan los resultados para formar la curva de crecimiento. Un total de 9 puntos en la curva es adecuado para determinar la cinética de crecimiento de la cepa para cada parámetro establecido.

#### **2.5.4. Caracterización genotípica**

– **Extracción de ADN de la cepa microbiana**

Para la obtención de ADN de la cepa microbiana se aplicó el protocolo de Murray y Thompson (1980) modificado para este trabajo, teniendo en cuenta las características del laboratorio. Para la recolección de células se centrifugó el medio empleado en la cinética de crecimiento, colocado el medio en tubos Falcon de 45

ml, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante. El pellet se colocó en vidrio reloj y secó en una estufa a 45°C.

Una vez seco el pellet, se raspó el vidrio reloj, se pesó 1 mg de muestra y se maceró en mortero con nitrógeno líquido hasta la formación de un polvo muy fino. Se colocó el polvo en un tubo Falcon con 3ml de buffer de extracción CTAB previamente calentado a 65°C. Se incubó durante 30 minutos a esta temperatura con agitación manual cada 10 minutos. Luego se centrifugó durante 10 minutos a 3500 rpm.

Se tomó el sobrenadante y se traspasó a tubo Falcon, al que se le añadió 2 ml de cloroformo isoamil-alcohol (24:1). Se agitó periódicamente cada tres minutos hasta completar 25 minutos y luego se centrifugó durante 10 minutos a 3500 rpm.

Se tomó el sobrenadante en un nuevo tubo; se adicionó 1,5 ml de isopropanol frío. Se agitó y se colocó a -20°C durante 24 horas durante toda la noche para centrifugar durante 10 minutos a 3500 rpm pasado ese tiempo. Al pellet se le adicionó 0,5 ml de etanol al 70% durante tres lavados y finalmente se le adicionó 0,5 ml de tampón TE 1x para su conservación a -20°C.

Para la observación de la presencia de ADN se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se preparó la cámara de electroforesis con un Buffer de Tris y se añadió CyberSafe como marcador de coloración. Se colocó la muestra de ADN en un posillo del gel, y se le hizo pasar una corriente de 100 mA durante 25 minutos. Luego se observó la presencia de ADN extraído de la cepa de actinomicetos.

#### – **Concentración y calidad del ADN obtenido**

La concentración se determinó a partir de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm partiendo de la fórmula:

$$C(\text{ADN}) = D.O \times 50 \times F.D$$

Donde la C(ADN): Concentración de ADN que se quiere conocer; D.O: Lectura de absorbancia medida en espectrofotómetro y F.D: Factor de dilución.

– **Condiciones de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Los cebadores empleados en la caracterización molecular se encuentran reflejados en la tabla y fueron propuestos para este grupo microbiano por Cook and Meyers en el año 2003.

**Tabla 7. Cebadores empleados para la PCR**

<b>Género</b>	<b>Cebadores y Secuencia</b>	<b>Long (pb)</b>
<i>Streptomyces</i>	F1 (5'- AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') I = inosine	458

**Nota: Cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa.**

**Fuente: elaborado por Beltrán, 2015.**

Las condiciones de amplificación fueron las publicadas por Freeman et al., en el 2000, previamente empleadas por el Grupo de Micología del Instituto en Investigaciones en Fruticultura Tropical de Cuba (IIFT) para microorganismos. Las reacciones de amplificación fueron realizadas con un volumen total de 25 µL: buffer Amplicon® (20 mM Tris-HCl pH 8.4; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>); 0.2 mM dNTP; 0.5 mM de cebadores; 0.04 U Taq polimerasa (Amplicon®); 20 ng de ADN y agua para PCR. Se selló la reacción con una gota de aceite rojo para evitar la pérdida por calor.

El programa de amplificación consistió en: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguida por 40 ciclos para desnaturalizar (95°C durante 30 s), alineamiento a 50°C por 30 s y, extensión a 72°C durante 1.5 min. Finalmente se realizó una extensión a 72°C por 10 min. Se empleó como control negativo de agua en cada ensayo para descartar la posible contaminación de los reactivos y como control positivo se usó una muestra de ADN de este género (*Streptomyces*) previamente identificado en la Universidad San Francisco y corroborado con cepas ATCC.

Los productos finales de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 2 % con bromuro de etidio en tampón TAE, marcador de peso molecular en transiluminador ultravioleta.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. De la selección de las zonas de muestreo

Se determina que las zonas seleccionadas para el muestreo de Actinomicetos fueron adecuadas, ya que presentan las condiciones aptas para el crecimiento microbiano y específicamente, permiten el crecimiento de Actinomicetos que puedan consumir sales biliares por estar en contacto con éstas. En el caso del Camal de Macas, la carga microbiana que se obtuvo fue elevada debido al mal manejo sanitario en este lugar y al incumplimiento de las disposiciones que se establecen en la Ley de Mataderos con respecto a la asepsia de las áreas de faenamiento y la eliminación de residuos. Por otro lado, la contaminación de las aguas del río Machángara es tan alta que permitió la obtención de una elevada fauna microbiana.

El resultado obtenido en el Camal de Macas es corroborado por Campozano et al (2009, pág. 31), quien menciona que el Ecuador cuenta con más de 200 mataderos y, debido este número elevado, las leyes que regulan su aspecto sanitario deberían ser claras y de su cumplimiento debidamente supervisado. Sin embargo, en los camales municipales del Ecuador el tema ambiental no tiene la relevancia debida, por la falta de recursos económicos y por el desconocimiento en cuanto a la gestión ambiental. Por estas razones la mayoría de camales municipales, los residuos sólidos y líquidos son dispuestos de manera inadecuada, generando un impacto adverso en la biodiversidad local y en el uso del agua (Ruiz, 2011, pág. 21).

De igual manera, el resultado que se obtuvo para el río Machángara es corroborado por López (2009, pág. 31), quien señala que el 75% del área urbana descarga sus aguas residuales en el Machángara y éste recibe la descarga de 9 colectores municipales que arrastran las aguas residuales de las actividades domésticas e industriales de la ciudad. Con ello, los niveles de contaminación de las aguas del río Machángara exceden los niveles máximos permisibles. Además, la contaminación de las aguas se ve

incrementada por la presencia de desechos sólidos en las riberas así como por las filtraciones subterráneas provenientes de los botaderos de desechos sólidos.

### **3.2. Del aislamiento y purificación de actinomicetos**

A partir de los muestreos realizados en las provincias de Pichincha y Morona Santiago, se obtuvieron 53 cepas aisladas; 40 de ellas provenientes del Camal de Sucúa y las 13 restantes del río Machángara. A continuación se presentan tablas de las cepas aisladas, purificadas y codificadas.



**Tabla 8. Cepas de Actinomicetos aisladas según su procedencia.**

<b>CÓD. CEPA</b>	<b>LUGAR DE ORIGEN</b>	<b>CÓD. CEPA</b>	<b>LUGAR DE ORIGEN</b>
<b>MMAE-1A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-20B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-4A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-21A</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-6A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-21B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-7A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-21C</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-8A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-21D</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-9A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-22A</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-10A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-22B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-10B</b>	Río Machángara	<b>MMAE-22C</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-11A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-22D</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-12A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-23A</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-13A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-24A1</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-14A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-24A2</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-15A</b>	Río Machángara	<b>MMAE-25A</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-16A</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-25B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-16B</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-25C</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-16C</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-26B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-16D</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-26C</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-17A</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-26D</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-17B</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-29B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-17C</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-30A</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-17D</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-30B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-18A</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-28A</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-19A</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-28B</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-19B</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-28C</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-19C</b>	Camal Sucúa	<b>MMAE-29A</b>	Camal Sucúa
<b>MMAE-19E</b>	Camal Sucúa		

**Nota: Resultados del aislamiento de cepas.**

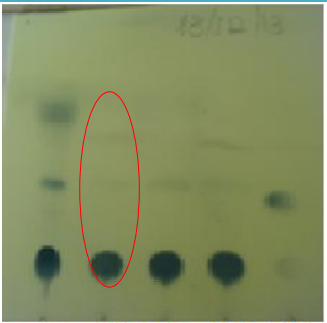
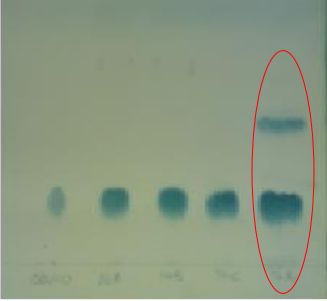
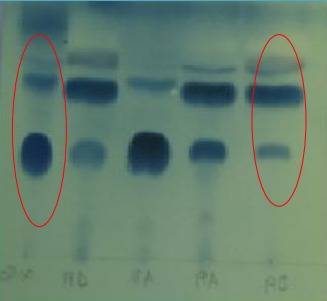

**Fuente: elaborado por Beltrán, 2015.**

### **3.3. Del Screening de la capacidad de biotransformación de los Actinomicetos aislados**

Al analizar las 53 cepas aisladas, se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas 10 y 11, donde se presenta el porcentaje en el que cada cepa actuó en presencia de la sal.

El criterio para determinar el porcentaje de biotransformación de cada cepa aislada se basa en la intensidad de la mancha obtenida en la placa cromatográfica y el rango de referencia (Rf) de la mancha. Se consideran los siguientes rangos:

**Tabla 9. Referencia del porcentaje de biotransformación.**

Imagen de Referencia	Interpretación por %
 <p data-bbox="418 630 743 667">ESTÁNDAR M1 M2 M3 M4</p>	<p data-bbox="883 310 1440 386"><b>Rango de porcentaje de biotransformación desde 0-25%:</b></p> <p data-bbox="883 401 1440 569">0-25%: se puede apreciar una ligera mancha en la parte inferior del microorganismo, mientras que la mancha del estándar ubicada en la parte superior se encuentra intensa.</p>
 <p data-bbox="418 970 743 1008">ESTÁNDAR M1 M2 M3 M4</p>	<p data-bbox="883 672 1440 747"><b>Rango de porcentaje de biotransformación desde 25-50%:</b></p> <p data-bbox="883 762 1440 930">25-50%: se puede apreciar una mancha de mayor intensidad en la parte superior del estándar del microorganismo, que muestra la presencia de un compuesto en una mayor concentración.</p>
 <p data-bbox="418 1310 743 1348">ESTÁNDAR M1 M2 M3 M4</p>	<p data-bbox="883 1012 1440 1087"><b>Rango de porcentaje de biotransformación desde 50-75%:</b></p> <p data-bbox="883 1102 1440 1318">50-75%: se puede apreciar una mancha de mayor intensidad en la parte superior del estándar del microorganismo. La mancha del estándar va disminuyendo y aumenta la intensidad de la mancha del compuesto obtenido.</p>
 <p data-bbox="418 1671 743 1709">ESTÁNDAR M1 M2 M3 M4</p>	<p data-bbox="883 1352 1440 1428"><b>Rango de porcentaje de biotransformación desde 75-100%:</b></p> <p data-bbox="883 1442 1440 1659">75-100%: se puede apreciar como las manchas de los estándares han desaparecido en el microorganismo, 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.</p>
<p data-bbox="297 1713 1440 1795">Nota: “-“: El microorganismo no presentó crecimiento y los espacios en blanco indican que el microorganismo no biotransformó la sal.</p>	

**Nota: Parámetros de comparación de la capacidad de biotransformación.**

**Fuente: elaborado por Beltrán, 2015.**

**Tabla 10. Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico.Camal Sucúa.**

N°	CÓD. MICROORG.	ÁC. DESOXICÓLICO		
		% de Biotransformación por horas de control		
		24	48	72
1	MMAE-16A			
2	MMAE-16B			
3	MMAE-16C			
4	MMAE-17A	50	75	75
5	MMAE-16D			
6	MMAE-17B			
7	MMAE-17C	25	25	50
8	MMAE-17D	25	25	50
9	MMAE-18A			
10	MMAE-19A	25	50	50
11	MMAE-19B	25	25	50
12	MMAE-19C			
13	MMAE-19D			
14	MMAE-19E			
15	MMAE-20B	25	50	50
16	MMAE-21A	25	25	25
17	MMAE-21B			
18	MMAE-21C			
19	MMAE-21D	25	25	25
20	MMAE-22A	25	25	25
21	MMAE-22B			
22	MMAE-22C			
23	MMAE-22D			
24	MMAE-23A			
25	MMAE-24A1			
26	MMAE-24A2			
27	MMAE-25A	-	-	-
28	MMAE-25B	-	-	-
29	MMAE-25C	-	-	-
30	MMAE-26B	-	-	-
31	MMAE-26C	-	-	-
32	MMAE-26D	-	-	-
33	MMAE-27A			
34	MMAE-28A			
35	MMAE-28B			
36	MMAE-28C			
37	MMAE-29A			
38	MMAE-29B			
39	MMAE-30A			
40	MMAE-30B	-	-	-

**Nota:** Porcentaje de biotransformación de cepas del Camal de Sucúa.

**Fuente:** elaborado por Beltrán, 2015.

**Tabla 11. Biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico. Río Machángara.**

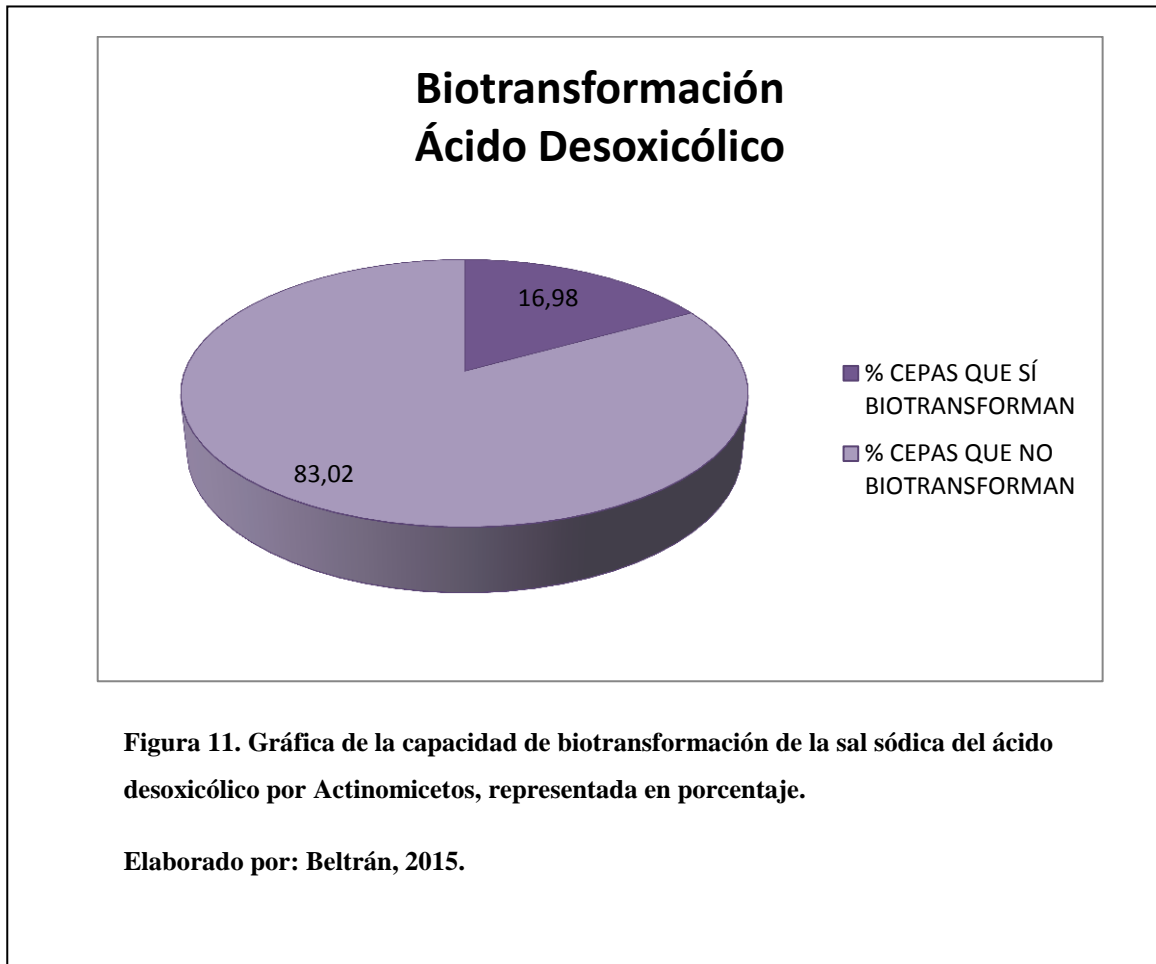
N°	CÓD. MICROORG.	ÁC. DESOXICÓLICO		
		Horas de Control CCP		
		24	48	72
41	MMAE-1A			
42	MMAE-4A			
43	MMAE-6A	-	-	-
44	MMAE-7A	-	-	-
45	MMAE-8A			
46	MMAE-9A			
47	MMAE-10A			
48	MMAE-10B			
49	MMAE-11A			
50	MMAE-12A			
51	MMAE-13A			
52	MMAE-14A	-	-	-
53	MMAE-15A	-	-	-

**Nota: Porcentaje de biotransformación de cepas del Río Machángara.**

**Fuente: elaborado por Beltrán, 2015.**

Se obtuvieron 9 cepas que actúan frente a la sal sódica del ácido desoxicólico, lo que representa el 17% del total.

### Capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico por actinomicetos



#### 3.4. De la selección de las cepas con máxima capacidad de biotransformación

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de biotransformación de las 9 cepas que actuaron en presencia de la sal sódica del ácido desoxicólico.

**Tabla 12. Porcentaje de Biotransformación de cada cepa aislada.**

<b>CÓDIGO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>% BIOTRANSFORMACIÓN</b>	<b>ORIGEN</b>
<b>17A</b>	72H	75%	CAMAL SUCÚA
<b>17C</b>	72H	50%	CAMAL SUCÚA
<b>17D</b>	72H	50%	CAMAL SUCÚA
<b>19A</b>	72H	50%	CAMAL SUCÚA
<b>19B</b>	72H	50%	CAMAL SUCÚA
<b>20B</b>	72H	50%	CAMAL SUCÚA
<b>21A</b>	72H	25%	CAMAL SUCÚA
<b>21D</b>	72H	25%	CAMAL SUCÚA
<b>22A</b>	72H	25%	CAMAL SUCÚA

**Nota:** Cepas que si lograron biotransformar la sal sódica del ácido desoxicólico.

**Fuente:** elaborado por Beltrán, 2015.

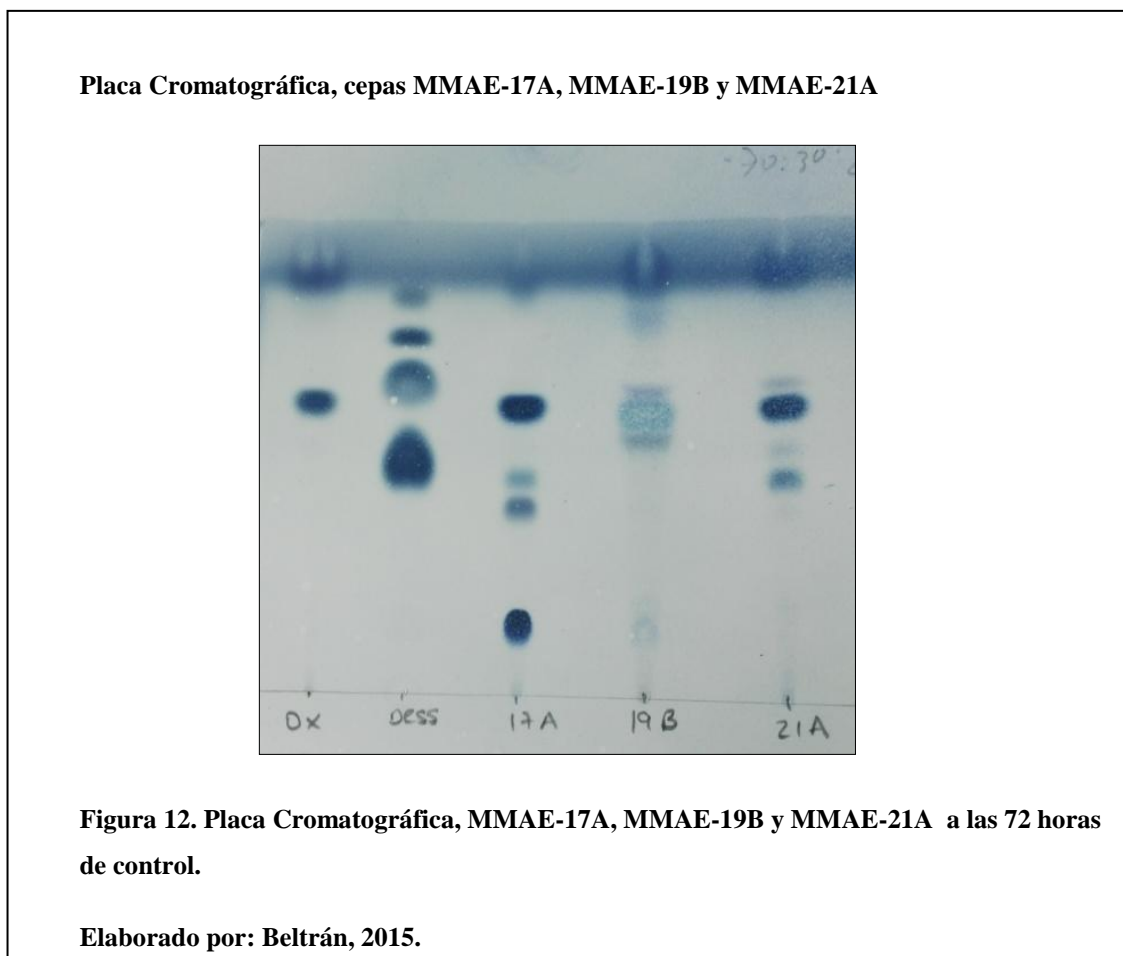
A partir de estos resultados se seleccionaron 3 cepas, las cuales tuvieron la capacidad más alta de biotransformación (representada en porcentaje) para realizar el escalamiento de cultivo. Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 13. Porcentajes de biotransformación en el escalamiento del cultivo.**

<b>CÓDIGO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>% BIOTRANSFORMACIÓN</b>	<b>ORIGEN</b>
<b>MMAE-17A</b>	72H	90%	CAMAL SUCÚA
<b>MMAE-19B</b>	72H	95%	CAMAL SUCÚA
<b>MMAE-21A</b>	72H	75%	CAMAL SUCÚA

**Nota:** Elaborado por Beltrán, 2015.

En la siguiente imagen se observa las manchas que se obtienen de las 3 cepas seleccionadas en su última corrida cromatográfica.



Las siglas que se muestran en la imagen anterior representan OX: estándar de ácido desoxicólico oxidado en C3 y DESS: estándar el ácido desoxicólico. Se observa que la cepa MMAE-17A presenta 4 manchas de las cuales, la más representativa es la que corresponde al ácido oxidado en C3. Además se observa otro compuesto cuya posición podría indicar que corresponde a una reducción del ácido desoxicólico.

### **3.5. De la interpretación de los espectros**

Al observar la placa se evidencia la presencia de un compuesto de interés producido por la cepa MMAE-17A. El producto final de esta cepa fue extraído y se obtuvo que, a partir



de 278mg de ácido desoxicólico, después de 48 h de incubación, la cromatografía de la mezcla de reacción en una placa cromatografica preparativa proporcionó el **ácido desoxicólico** (150 mg, 54%) y el **producto** (106 mg, 38%) en cual, al ser analizado mediante la técnica  $H^1$ -NMR fue identificado como **3-ceto-desoxicólico**, producto de oxidación en C3. En el anexo 5 se encuentran los datos espectroscópicos del **ácido desoxicólico**:  $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ ) cuyos picos seleccionados fueron  $\delta$ : 0.75 (s, 3H-18), 0.97 (s, 3H-19), 1.05 (d, J = 6.0 Hz, 3H-21), 3.57 (m, 1H, H-3), 4.01 (m, 1H, H-12) y, en el anexo 6 se observa que desaparece el pico a 3,57 ppm (m, 1H, H-3) correspondiente al -OH del ácido desoxicólico.

### 3.6. De la identificación de la cepa MMAE-17A

El resultado obtenido en base a las pruebas bioquímicas Microgen GEN A+B indicó que la cepa gram positiva (prueba de tinción de Gram) MMAE-17A se trata de un *Alcaligenes faecalis*, con una probabilidad del 48%. Según el fundamento de estas pruebas, este porcentaje de probabilidad es muy bajo, por lo que podría corroborarse así que no se trata de una cepa bacteriana propiamente dicho, sino de una cepa de actinomicetos.

#### Resultado pruebas Microgen Gen A+B

##### Identification Comments

##### Unacceptable Identification of *Alcaligenes faecalis* type 11

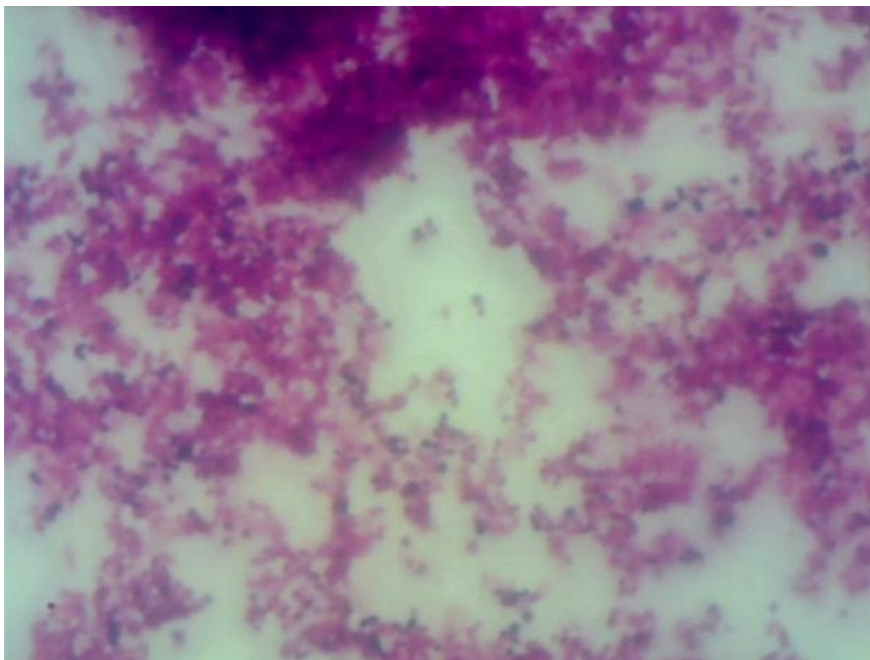
The strain is not typical (multiple tests are against), and it is poorly separated from other suggested identification choices  
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Figura 13: Resultado proporcionado por el Software de Identificación del Sistema Microgen.

Elaborado por: Beltrán, 2015.

Las células se observaron en un microscopio electrónico. En la siguiente imagen se muestran las células de color azul.

**Vista al microscopio de cepa MMAE-17A**



**Figura 14: Vista al microscopio de células gram positivas.**

**Elaborado por: Beltrán (2015)**

Debido a que estos resultados no proporcionan la información suficiente para la identificación de la cepa MMAE-17A, es necesaria su caracterización fenotípica y genotípica.

### **3.7. De la caracterización fenotípica**

#### **3.7.1. Morfología**

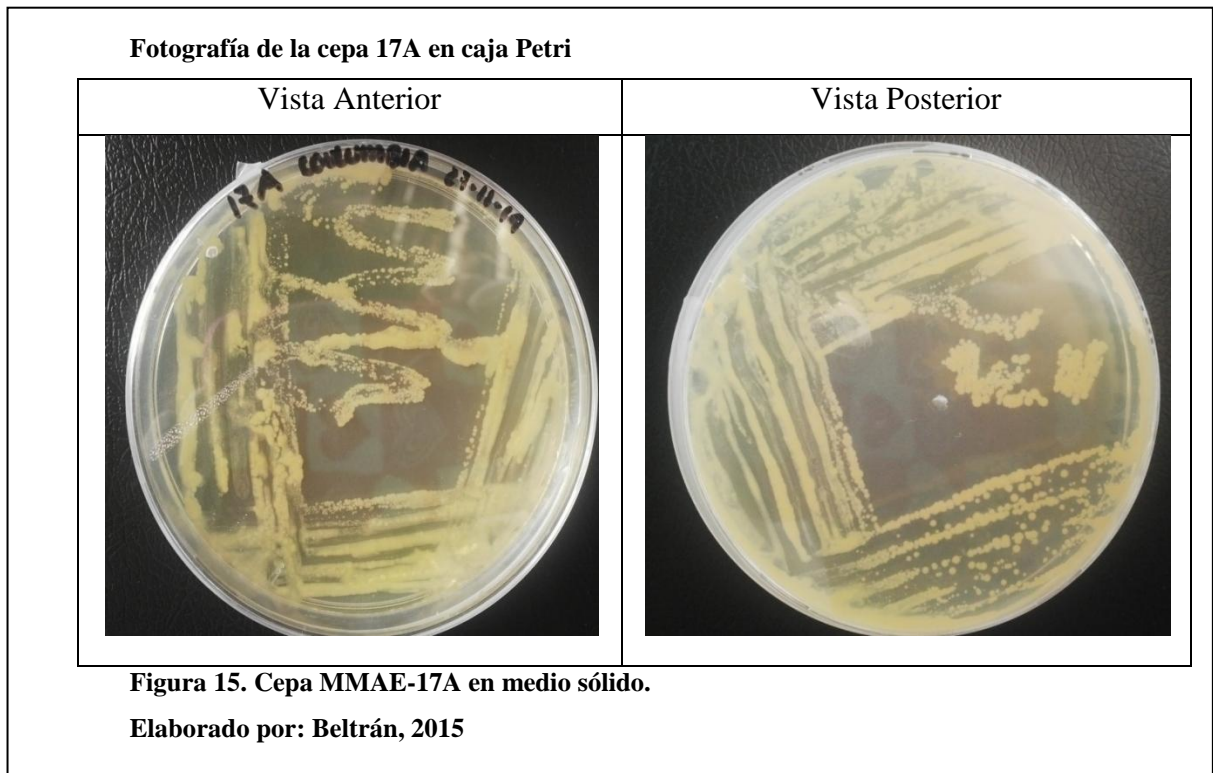
La morfología que presentó la cepa MMAE-17A se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 14: Caracterización Morfológica de la cepa MMAE-17A.**

Parámetro de caracterización de las colonias	Descripción
<b>Color</b>	Amarillo claro
<b>Forma</b>	Circular
<b>Superficie</b>	Planoconvexa
<b>Borde</b>	Ondulado

**Nota:** Caracterización morfológica de la cepa obtenida.

**Fuente:** elaborado por Beltrán, 2015.



### 3.7.2. Medición de células

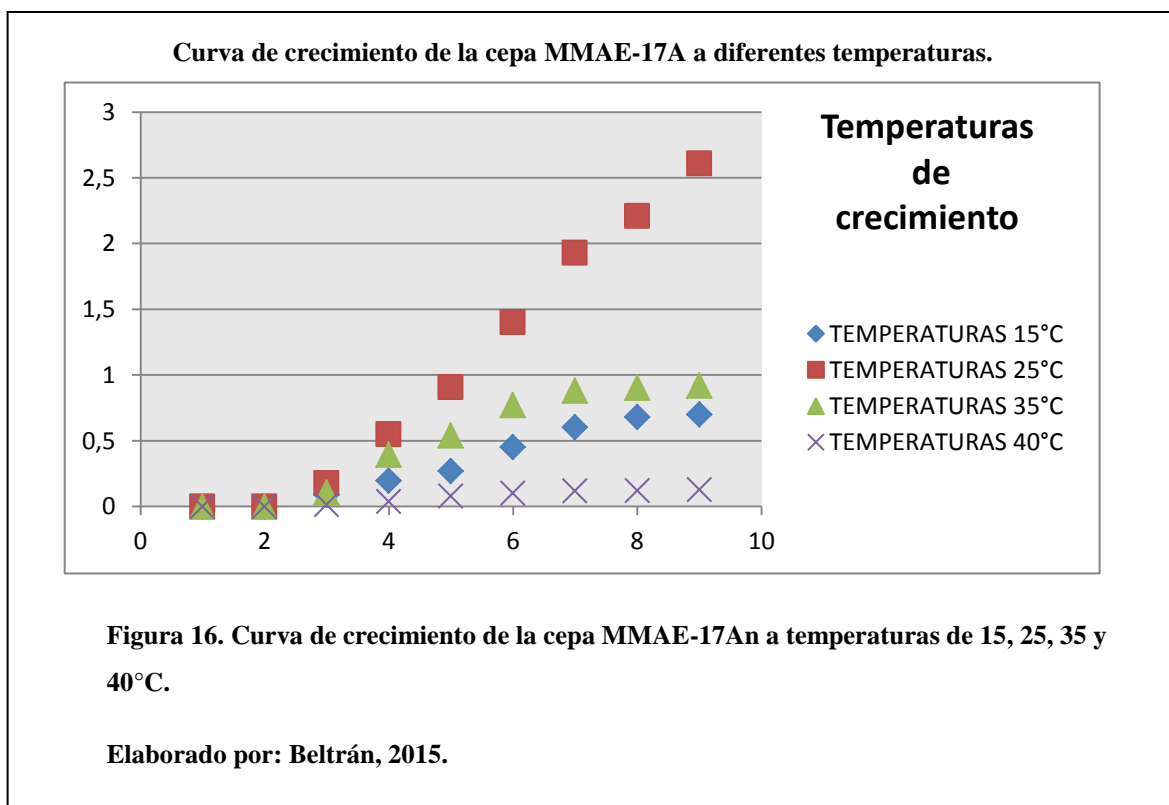
Los resultados de la medición de células arrojaron una media de 1.3  $\mu\text{m}$  como diámetro mayor y 0.8  $\mu\text{m}$  como menor y una longitud media de 5.8  $\mu\text{m}$  por lo que, si se compara con los valores correspondientes al género *Streptomyces* según lo publicado por Polti et al (2009); Loria et al (2006) y Loria et al (2010), además de lo publicado por el sitio web

para este género, <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesb.html>, se obtienen valores que se corresponden.

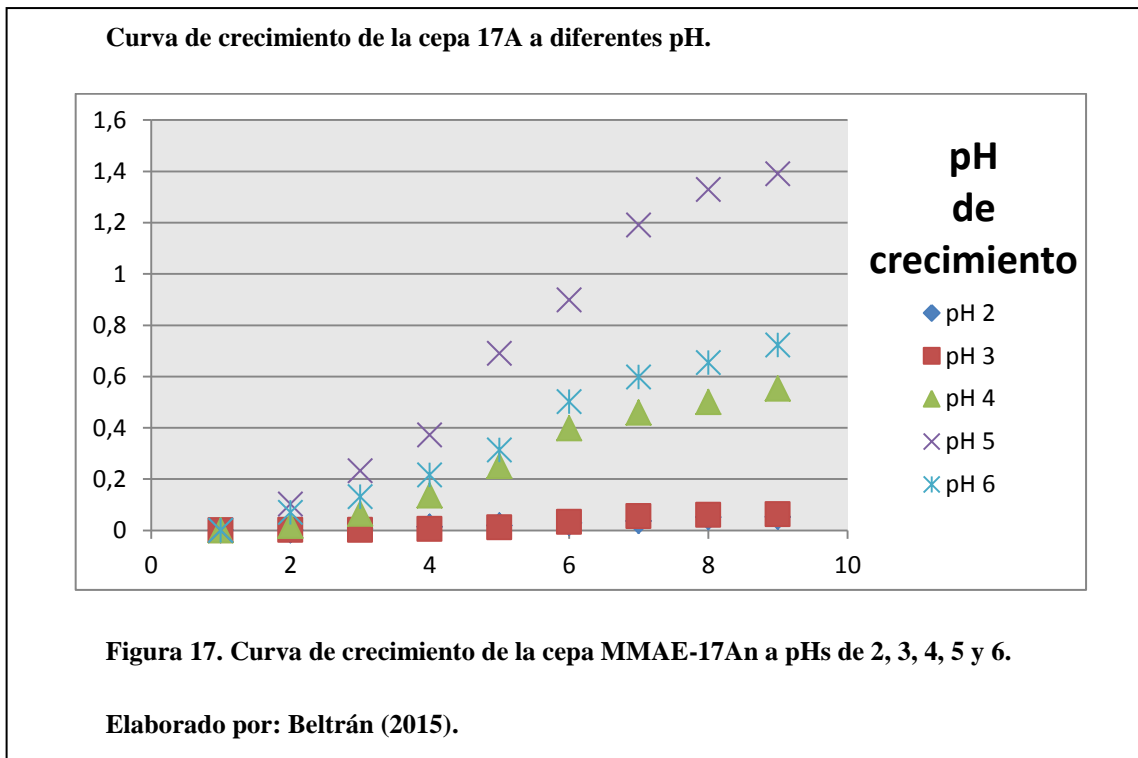
### 3.7.3. Cinética de Crecimiento

Al exponer a la cepa MMAE-17A a diferentes temperaturas y condiciones de pH se obtuvo que la temperatura óptima para el crecimiento de esta cepa es de 25°C y el pH óptimo es de 5. De la misma manera, Revollo (2012) indica que la temperatura óptima de crecimiento de varias especies de actinomicetos es 25°C, aunque algunos de ellos pueden llegar a crecer adecuadamente a temperaturas de 37°C (pág. 27). En cuanto al pH, se obtuvo que el pH de óptimo crecimiento para la cepa MMAE-17A es de 5. Serrano (2006, pág. 66) señala que los actinomicetos se han desarrollado para adaptarse a condiciones de salinidad y pH extremos, sin embargo su crecimiento es mejor cuando el pH no es menor a 5.

La siguiente gráfica representa la comparación de las curvas de crecimiento a diferentes valores de temperatura.



La siguiente gráfica representa la comparación de las curvas de crecimiento a diferentes valores de pH.

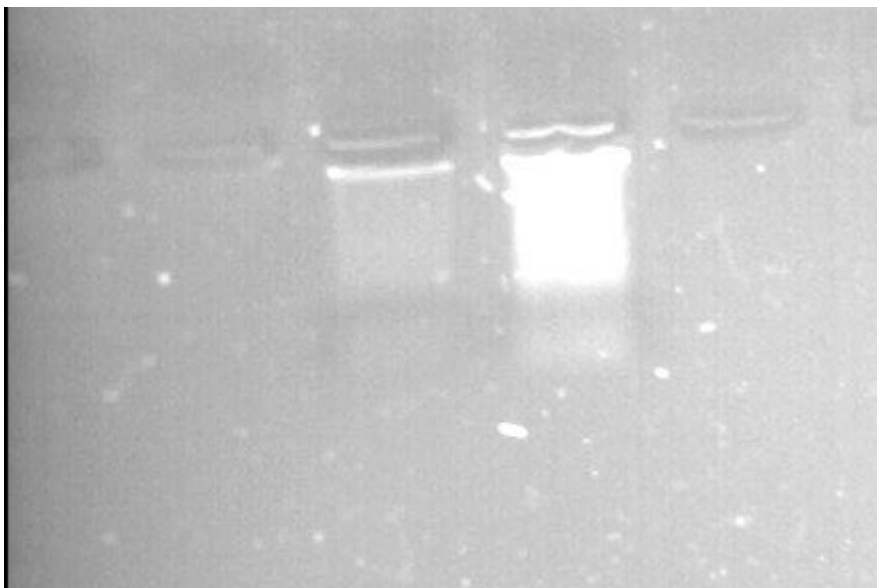


### 3.8. De la caracterización genotípica

#### 3.8.1. Extracción de ADN

Los resultados obtenidos por el método empleado se muestran en la figura 19, en la que se aprecian bandas fluorescentes luego de haber sido modificado el protocolo original.

**Gel de agarosa 2% con muestra de ADN**



**Figura 18. ADN de la cepa MMAE-17A en gel de agarosa al 2%.**

**Elaborado por: Beltrán, 2015.**

Los agentes quelantes (como el EDTA) se emplean para proteger el ADN de la acción de enzimas nucleasas; ellos capturan los iones magnesio y no permiten que actúen como cofactores de las nucleasas en el momento de la lisis celular por la acción mecánica de la maceración a temperaturas muy bajas, como es el caso en que se emplea nitrógeno líquido (Porebski et al, 1997, pág. 319).

Las altas concentraciones (5 M) de NaCl se emplean para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afectan la pureza del ADN, pudiendo inhibir la actividad de algunas enzimas como polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción; la base para la separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos, es su solubilidad diferencial que en presencia de las altas concentraciones de NaCl precipitan bajo la acción de fuerzas centrifugas.

A la mezcla anterior se le agrega un detergente aniónico como el SDS (sodio dodecilsulfato), que solubiliza proteínas, tejidos y membranas, evitando que una cantidad significativa de ADN quede atrapada en los desechos o restos celulares.

La separación de las proteínas se verá condicionada sólo por su tamaño y no por su carga ya que con el uso del detergente (SDS) éstas son desnaturalizadas y desplegadas, quedando pegadas a su superficie, confiriéndole una gran carga negativa. Esa gran carga negativa enmascara la carga intrínseca de las proteínas presentando la misma entre todas, haciendo la separación solamente por la masa molecular de las mismas.

Weir et al, (1996), utiliza SDS (Sulfato Dodecyl de Sodio) como detergente que disocia proteínas de ADN y lo hace más accesible a la degradación por proteinasas usadas durante la técnica de aislamiento (Valadez y Kahl, 2000). En este caso, se empleó el procedimiento de encubar toda la noche a bajas temperaturas (-20°C) con isopropanol para evitar el uso de proteinasa.

El ARN es otro de los contaminantes frecuentes en las extracciones de ADN, por lo que es necesaria la adición de enzimas degradadoras de estas moléculas (RNAsa) donde, la concentración e incubación al final de la extracción, está dada por el tipo de RNAsa empleada. (Weir et al, 1996; Csaikl et al, 1998; Stange et al, 1998).

### **3.8.2. Concentración y Calidad de ADN**

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta (UV) debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas. La absorción de UV del DNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de una molécula en general.

Cuando se aísla y se purifica ADN, frecuentemente es necesario obtener información acerca de su pureza. El ADN tiene una absorbancia máxima en 260 nm, mientras que las

proteínas, las cuales son las impurezas más comunes en preparaciones de ADN, tienen una absorbancia máxima de 280 nm.

En la tabla 10 se presenta la relación entre la absorbancia 260/280 nm por el método de extracción empleado. Los valores extremos: máximo (1.9198) y mínimo: (1.6016) fueron obtenidos de la relación en las lecturas de D.O.

**Tabla 15. Relación de absorbancia.**

Relación de absorbancia entre 260/280 nm	
Valor máximo	Valor mínimo
1.9198	1.6016

**Nota: Relación de la absorbancia.**

**Elaborado por Beltrán, 2015.**

En la práctica, la relación de absorbancia 260/280 nm, es usada como una medida cualitativa de la pureza del ADN. Esta es la razón por la cual esas dos longitudes de onda son usadas para verificar la pureza. Si la relación está entre 1.6 y 2.0 la preparación de ADN es considerada pura porque se encuentra libre de contaminantes celulares. Una relación menor indica contaminación con proteínas o fenoles y valores por arriba de 2 significa que hay ARN disperso (Doulis et al, 2000; Bruses et al, 2000). Es notable que ambos valores: mínimo y máximo se encuentren en el rango que se plantea cuando existe un ADN con la calidad necesaria para realizar trabajos moleculares, por lo que este método de extracción además de ser confiable es efectivo para la cepa en estudio.

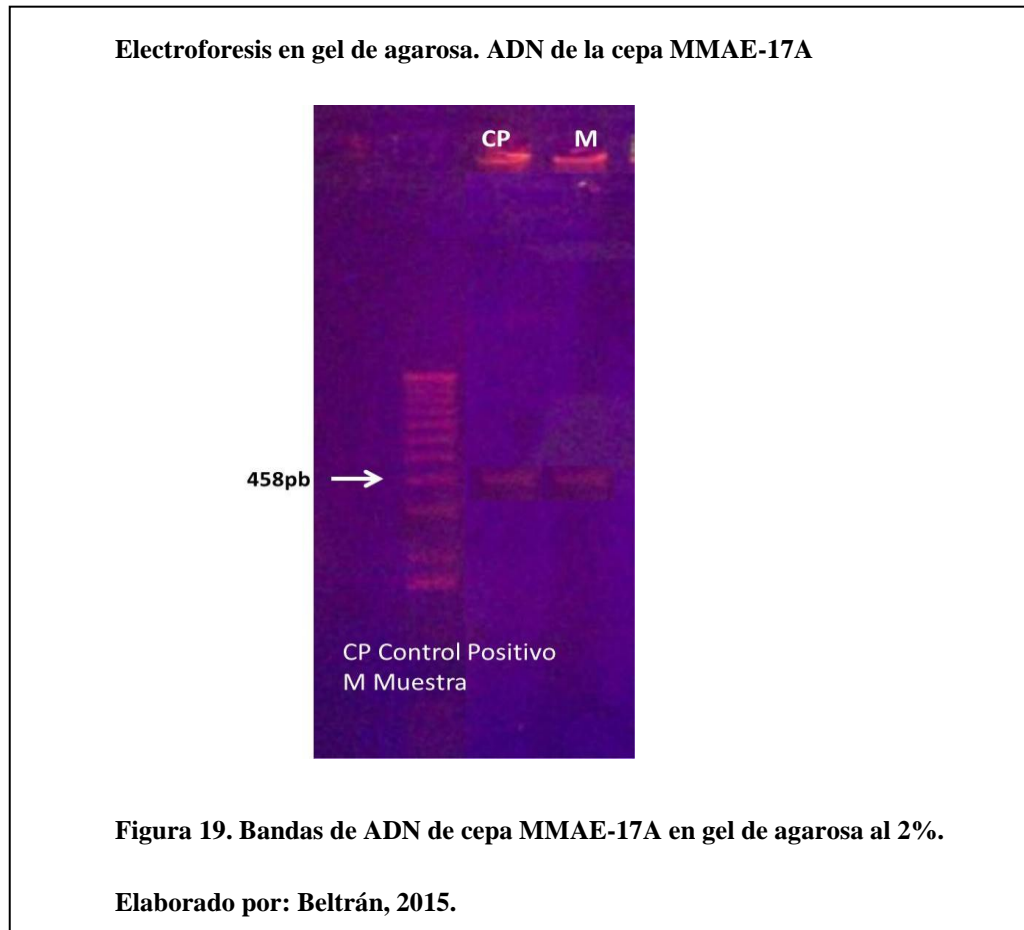
### **3.8.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Debido a que el cambio en las secuencias de los genes de rRNA es muy lento, la comparación de estas puede ser utilizada para estudiar la evolución entre organismos distantemente relacionados, mientras que las regiones no codificantes, ITS (internal transcribed spacer) e IGS (intergenic spacer región), cambian rápidamente y son útiles para la comparación de especies microbianas dentro de un género o cepas dentro de una especie. Por este motivo, las regiones espaciadoras internas de transcripción de los RNA



ribosómicos, ITS, surgen como un concepto de la biología molecular para la tipificación genética de microorganismos (Said et al, 2007).

En la figura 18 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR empleada para identificación de los aislados con los cebadores empleados.



Teniendo en cuenta las características fenotípicas y genotípicas de la cepa en estudio, se puede decir que se trata de una especie del género *Streptomyces*, coincidiendo con autores como Patzer y Volkmar, quienes en el 2010 realizaron un estudio de varias especies de este género para corroborar su capacidad de síntesis de determinados sideróforos. En el 2006, Chater and Chandra publicaron el estudio comparativo de varias especies del género, donde el empleo de dichos cebadores permitió la discriminación de cepas aisladas con características morfoculturales semejantes pero que, después de la caracterización molecular llevada a cabo, se obtuvo que algunas de estas no pertenecían a *Streptomyces*, a pesar de constituir actinomicetos.

## CONCLUSIONES

- El Camal de Macas y el río Machángara resultaron ser lugares apropiados para el aislamiento de actinomicetos debido a su alta contaminación con residuos del faenamiento de animales y en general, con contaminantes que sirven de sustrato para el crecimiento de actinomicetos.
- Al finalizar el Screening se obtuvo que, de un total de 53 cepas aisladas de actinomicetos, 9 de ellas fueron capaces de biotransformar la sal sódica del ácido desoxicólico, lo que constituye el 16,98% del total.
- De 9 cepas que biotransformaron la sal sódica del ácido desoxicólico, 3 de ellas biotransformaron la sal en un porcentaje mayor o igual al 75% en un periodo de 72 horas.
- En el escalamiento de cultivo, las 3 cepas seleccionadas elevaron su capacidad de biotransformación. MMAE-17A pasó de biotransformar 75% en 72 horas a 90% en 72 horas. MMAE-19B pasó de 60% a 95% y MMAE-21 lo hizo de 30% a 75%.
- Ninguna cepa de los actinomicetos aislados biotransformó la sal sódica del ácido desoxicólico en un 100% en un periodo de 72 horas en el escalamiento de cultivo. El porcentaje más cercano a este valor corresponde a la cepa MMAE-19B, la cual logró oxidar casi la totalidad del ácido a CO<sub>2</sub>.
- La cepa MMAE-17A fue la cepa seleccionada para realizar el análisis del metabolito resultante de su biotransformación, debido a que presentó un alto porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico y los productos observados en la placa resultaron interesantes.
- Al analizar mediante resonancia magnética el metabolito producido por la cepa MMAE-17A se obtuvieron espectros claros, que permitieron determinar que éste corresponde al ácido 3-ceto-desoxicólico, producto de oxidación en C3.
- En cuanto a la identificación de la cepa MMAE-17A, las pruebas bioquímicas Microgen GN A+B no proporcionaron resultados confiables para determinar a qué cepa microbiana corresponde. Esto puede deberse a que las pruebas son diseñadas para enterobacterias que degraden los diferentes sustratos. Sin embargo, estas pruebas sí sirvieron como punto de referencia; al obtenerse un porcentaje de 48% de probabilidad

de ser *Alcaligenes faecalis*, se puede concluir que no se trata de una cepa de bacteria propiamente dicha sino de un actinomiceto, lo que fue corroborado con las pruebas posteriores.

- Al caracterizar a la cepa MMAE-17A, se obtuvo que se trata de un microorganismo gram positivo, cuyo crecimiento óptimo en medio líquido se da a una temperatura de 25°C con un pH ácido de 5. Su caracterización permitió determinar que esta cepa corresponde al género *Streptomyces*, un grupo de actinomicetos de mucha importancia para la obtención de sustancias de interés biológico como antibióticos, antifúngicos y antitumorales.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar al actinomiceto MMAE-17A perteneciente al género *Streptomyces* para realizar una oxidación en la posición C3 de la estructura de la sal de sódica del ácido desoxicólico para posibles aplicaciones en la industria farmacéutica, química o biotecnológica.
- Debido a que no se conoce exactamente el sistema enzimático que poseen los Actinomicetos para degradar sustancias, se recomienda realizar investigaciones dirigidas a identificar las enzimas que actúan en el metabolismo secundarios de las cepas de Actinomicetos de mayor interés industrial.
- Se sugiere utilizar la cepa MMAE-19B en nuevas investigaciones dirigidas a la biotransformación de sustratos, debido al gran potencial de sus complejos enzimáticos para oxidar en un periodo de 48 horas casi todo el ácido desoxicólico en CO<sub>2</sub>.
- Debido a que se llegó a la identificación molecular de la cepa hasta el género, se recomienda realizar en futuras investigaciones, la identificación DE la especie de *Streptomyces* a la que corresponde la cepa MMAE-17A.
- El muestreo en lugares donde no necesariamente exista contaminación con residuos del faenamiento de animales, podría ser útil para la obtención de cepas microbianas. Los suelos de la Amazonía ecuatoriana, por citar un ejemplo, serían una buena fuente de actinomicetos debido a la gran biodiversidad que esta región del país posee.
- En necesario revisar todas las investigaciones realizadas para la biotransformación con ácidos biliares y el tipo de microorganismo que se ha empleado en cada investigación para no repetir procedimientos que llevarán a un mismo resultado, sino más bien crear nueva información.

## GLOSARIO

**Epimerización:** es la interconversión de epímeros (difieren en la configuración de un átomo de carbono quiral).

**Oxidación:** ocurre cuando un átomo pierde un electrón, lo que permite que el átomo forme un compuesto nuevo con otro elemento. El proceso mediante el cual hay pérdida aparente de electrones de un átomo o ión.

**Reducción:** es un proceso mediante el cual los átomos o iones adquieren electrones.

**Dehidroxilación:** es la descomposición de una sustancia en radicales  $H^+$  y  $OH^-$  para formar agua. También se conoce como la pérdida del agua química por el rompimiento de los enlaces químicos entre los radicales.

**Clearance hepático:** corresponde al volumen de plasma que el hígado puede depurar de una sustancia determinada por unidad de tiempo. Se expresa generalmente en mililitros por minuto.

**Colagogo:** son fármacos o extractos de plantas que facilitan la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar, y casi siempre van acompañados de acción purgante intestinal.

**Mesoterapia:** es una técnica de medicina alternativa que consiste en tratar las zonas afectadas con microinyecciones de medicamentos de medicina convencional, homeopática, vitaminas, minerales o aminoácidos.

**Revelador:** son sustancias o compuestos que se utilizan para observar las manchas de un compuesto que a simple vista no se distinguen.

**Recidiva:** es la reaparición de los trastornos médicos (tumores, cálculos, etc.) tras un periodo más o menos largo de ausencia de enfermedad.

**Hepatobiliar:** relacionado a la vesícula biliar, conductos biliares, hígado y páncreas.

**Forma cocácea:** forma esférica, de pequeño tamaño.

**Homeostasis:** es una propiedad de los organismos vivos que consiste en su capacidad de mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior.

**Organismo mesófilo:** aquel que tiene una temperatura óptima de crecimiento de entre 15 y 35 °C.

**Organismo termófilo:** aquel que puede soportar condiciones extremas de temperatura relativamente altas, por encima de los 45°C. Es un subtipo de vida extremófila.

**Anfipáticas:** son aquellas moléculas que poseen un extremo hidrofílico o sea que es soluble en agua y otro hidrófobo o sea que rechaza el agua.

**Biolixiviación:** es un proceso natural de disolución, ejecutado por un grupo de bacterias que tienen la habilidad de oxidar minerales sulfurados, permitiendo la liberación de los valores metálicos contenidos en ellos.

**Bioacumulación:** es el proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en el medio ambiente o en los alimentos. Las sustancias propensas a la bioacumulación alcanzan concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico en la cadena alimenticia.

**Hifa:** son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos que conforman su estructura vegetativa.

**Ácido nucleico diana:** se refiere al ácido nucleico que va reaccionar al estímulo específico al que va a ser sometido.

## LISTA DE REFERENCIAS

ACOFARMA (2011). *Ficha de información técnica del Ácido Ursodesoxicólico*.

Aguado J., Morales J. & Salto E. (1993). *Encrusted pyelitis and cystitis by Corynebacterium urealyticum (Corynebacterium group D2): a new and threatening complication following renal transplant*.

Álvarez D. (2009). *Síntesis, actividad biológica y bases moleculares de acción de análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales*. Universidad de Buenos Aires.

Araujo M. & Ruiz A. (2014). *Aislamiento de microorganismos con la capacidad de biotransformar los ácidos biliares hyodesoxicólico y desoxicólico*. Universidad Politécnica Salesiana. Quito- Ecuador.

Arcilla L. & Fernández J. (2008). *Estudio de la fracción insaponificable obtenida del aceite extraído de la semilla de la Luffa cylindrica*. Universidad Tecnológica de Pereira.

Brusés B., Lucero H., Aguirre M. & Gorodner J. (2000). *Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de Trypanosoma cruzi mediante la Técnica de PCR*. Recuperado de: [www.unne.edu.ar/cyt/2000/3\\_medicas/m\\_pdf/m\\_011.pdf](http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf).C

Campozano J., Barco J. & Balda C. (2009). *Implementación de nuevos potreros de ganado vacuno a través de un proceso de optimización logística y del espacio*. Revista Tecnológica ESPOL. Quito –Ecuador.

Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia CARPL. (2003). *Aplicaciones de la biotecnología en la industria*. España.

Chater and G. Chandra. 2006. *The evolution of development in Streptomyces analyzed by genome comparisons*. FEMS MicrobiolRev, 30. pp. 651–672.

Cook, A. & Meyers P. (2003). *Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S RNA gene restriction fragment patterns*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Csaik U., Batian H., Brettschneider R., Gauch S., Meir A., Schauerte M., Scholz F., Upersien C., Vornam & Ziegenhagen B. (1998). *Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, Universal maxi-preparation of High quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies*. *Plant Molecular Biology Reporter*.

Doulis A., Harfouche A. and Aravanopoulos F. 2000. *Rapid High Quality DNA Isolation from Cypress (Cupressus sempervirens L.) Leaves and Optimization of the RAPD Marker Technique*. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-14.

Daza A. & Pineda J. (2014). *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*. Universidad Politécnica Salesiana. Quito-Ecuador.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Scheleife K., Stackebrandt E. (2006). *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Vol.3. Third Edition. Springer.

Elguero J. (2006). *Resonancia magnética nuclear de protón: Aplicaciones en química orgánica*. Centro de Química Orgánica “Manuel Ioya Tamayo”.

Fernández E. (2013). *Papel central de los citocromos p450 en el catabolismo del colesterol y su regulación en micobacterias*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid- España.



Fernández M., Sáez J., Valdezate S., Rodríguez R., Lapeña S., Cachón F. & Soriano F. (2009). *Isolation of Corynebacterium ureicelerivorans from normally sterile sites in humans*. Eur J Clin Microbiol.

Hirsch A. & Valdés M. *Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels*. Soil Biology y Biochemistry. 2009. No.10.

Hernández D. (2008). *Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Universidad Tecnológica de Pereira.

Ibrahim G. (2012). *Formación de cálculos biliares de colesterol. Nuevos avances científicos*. Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología Vol. 66.

Juste M. (2005). *Litiasis Biliar. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica*. SEGHNP-AEP.

Larraona P. & Manjavaca A. (2008). *Resonancia magnética nuclear (RMN)*.

Leiva S. (2006). *Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la Microbiota Bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia*. Universidad de Chile.

Linares G. (2008). *Universidad Mayor de San Andrés. Optimización cromatográfica por HPLC en la determinación de ácidos biliares*. La Paz – Bolivia.

López H. (2009). *Sistema de recolección diferenciado de residuos sólidos para la zona urbana de Quito a cargo de EMASEO*. Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito – Ecuador.

Loria R., Clark C., Bukhalrd R. & Fry B. (2010). *Gram positive bacteria. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3th ed. APS Press. NW Schaad Editor.

Loria R., Kers J. & Joshi M. (2006). *Evolution of plant pathogenicity in Streptomyces*. Rev. Phytopathol.

Lucareli C. (2010). *Perfil de Ácidos Biliares*. Laboratorios IACA.

Maldonado L., Fenical W., Jensen P., Kauffman C, Mincer T., A Ward A & Goodfellow M. (2005). *Salinispora arenicolagen. nov., sp. nov. and Salinisporatropica sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae*. Int J SystEvolMicr.

Maldonado M. (2013). *Biotrasformazioni di Acidi Biliari*. Universidad de Ferrara. Italia.

Mamianeti A. (1999). *Micolitiasis vesicular y ácidoursodesoxicólico*. Hospital Aeronáutico de Buenos Aires. Buenos Aires – Argentina.

Manual del Pruebas Bioquímicas Microgen (2014).

Marca C. (2012). *Perfil esteroideo en deportistas de baloncesto, de ambos sexos y su relación con parámetros físicos, genéticos y nutricionales*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid – España.

Molina J. (1999). *Lípidos*. Departamento de Biología y Geología. IES Francisco Pacheco.

Murray M. & Thompson W. (1980). *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research*.

Pedrini P., Andreotti E., Guerrini A., Dean M., Fantin G. & Giovannini P. (2006). *Steroids*. Universidad de Ferrara. Italia.

Polti, M. A., García, R. O., Amoroso, M. & Abate, C. (2009). *Bioremediation of chromium (VI) contaminated soil by Streptomyces sp. MC1*. J Basic Microbiol.

Porebski S., Grant Bailey L., & Baum B. (1997). *Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components*. Plant Molecular Biology. 15 (1): 8-15.

ProEcuador. (2013). *Biotecnología*. Quito – Ecuador.

Revollo E. (2012). *Caracterización de actinomicetos raros degradadores de lignocelulosa: demostración de la actividad lacasa en dos aislados de Tsukamurella sp y Cellulosimicrobium sp*. Universidad Industrial de Santander.

Rocha H. (2006). *Bioquímica - Metabolismo de los lípidos*. 2da Edición. Chile.

Salazar A. & Ordoñez C. (2013). *Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Universidad de Pereira.

Santambrosio E. (2009). *Tinción y observación de microorganismos*. Universidad Tecnológica Nacional. Chile.

Stange C, Prehn D y Arce-Johnson P. 1998. *Isolation of Pinusradiata genomic DNA suitable for RAPD analysis*. Plant Molecular Biology Reporter 16: 1-8.

Soler T. (2012). *Preparación de estructuras derivadas de productos naturales (hidratos de carbono, esteroides y alcaloides) a través de intermedios organolíticos funcionalizados*. Universidad de Alicante. Italia.

Somma M. (2009). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. World Health Organization Regional Office for Europe.

Soffer F. (2000). *Tratamiento no quirúrgico de la litiasis biliar*. Rev Fac Med UNAM Vol.43 No.4.

Tamay L. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F.

Timón R. (2002). *Variaciones del perfil esteroideo con diferentes tipos de ejercicio y actividad física*. Universidad de Extremadura.

Vaquero J. (2013). *Papel del receptor nuclear de ácidos biliares NR1H4 ("FARNESOID X RECEPTOR", FXR) en el control de la expresión de genes implicados en el desarrollo de quimiorresistencia. Características funcionales de sus isoformas*. Universidad de Salamanca.

Vimal V. (2009). *Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, Nocardiosis sp. VITSVK 5 (FJ973467)*. Asian Journal of Medical Sciences.

Willey J., Sherwood L. & Woolverton C. (2009). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. 7ma Edición. Editorial McGraw Hill. España – Madrid.

## ANEXOS

### Anexo 1. Fotos del muestreo

Descripción	Imagen
<b>Muestreo fosas - aguas residuales</b>	 A photograph showing two individuals wearing blue gloves and face masks, kneeling on the ground next to a concrete-lined pit. They are using a long-handled tool to stir or sample the dark, turbid water within the pit. A red cooler is visible nearby.
<b>Muestreo Camal de Sucúa</b>	 A photograph showing two individuals wearing blue gloves and face masks, kneeling on the ground next to a concrete-lined pit. They are using a long-handled tool to stir or sample the dark, turbid water within the pit. A red cooler is visible nearby.
<b>Muestreo en vísceras de animales</b>	 A dark, low-light photograph showing several pieces of animal viscera (internal organs) laid out on a surface, likely for sampling or analysis.

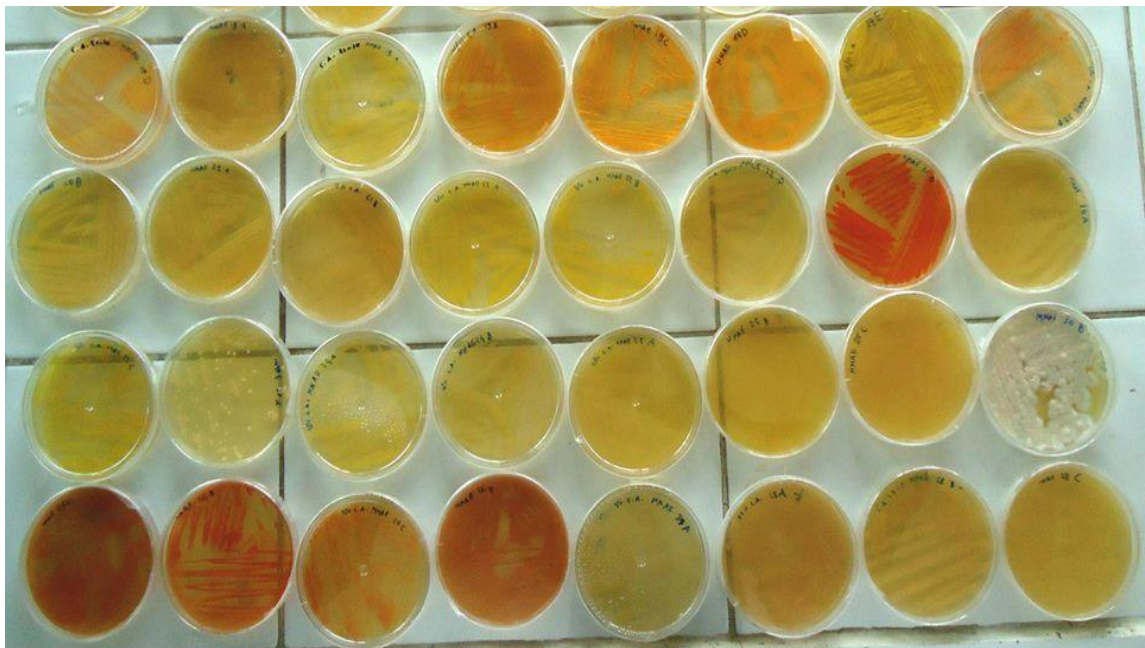
**Muestreo en pisos del camal**




**Cooler con las muestras tomadas**





**Anexo 2. Cepas de actinomicetos aisladas y codificadas.**

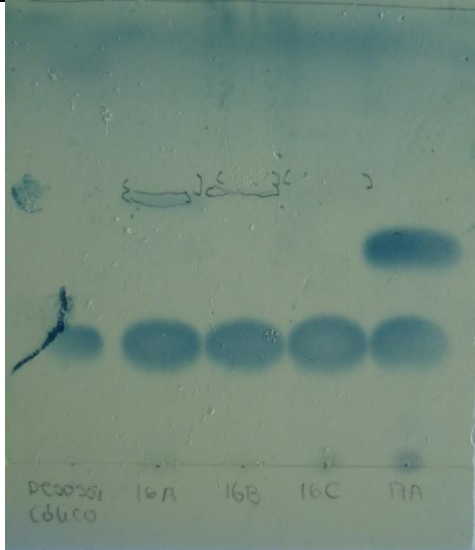


**Anexo 3. Procedimiento Screening de la capacidad de biotransformación.**

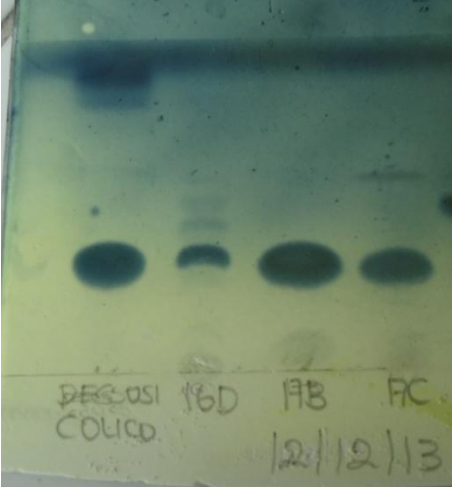
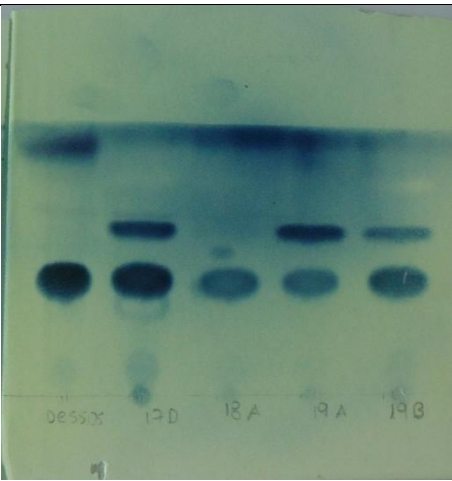
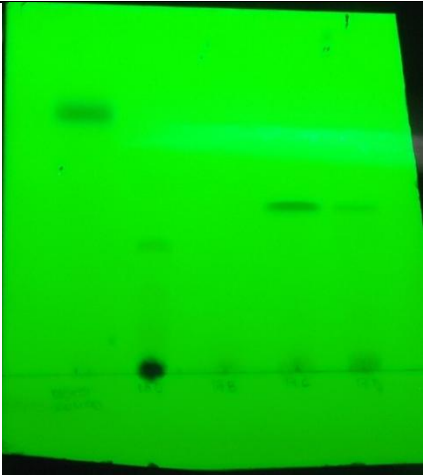
<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>IMAGEN</b>
<b>Cultivo líquido de microorganismos</b>	
<b>Muestras en Tubos Eppendorf</b>	
<b>Revelación de placas cromatográficas</b>	
<b>Raspado de placa preparativa</b>	

<p><b>Evaluación de la cinética de crecimiento</b></p>	
<p><b>Pruebas Microgen GN A+B</b></p>	

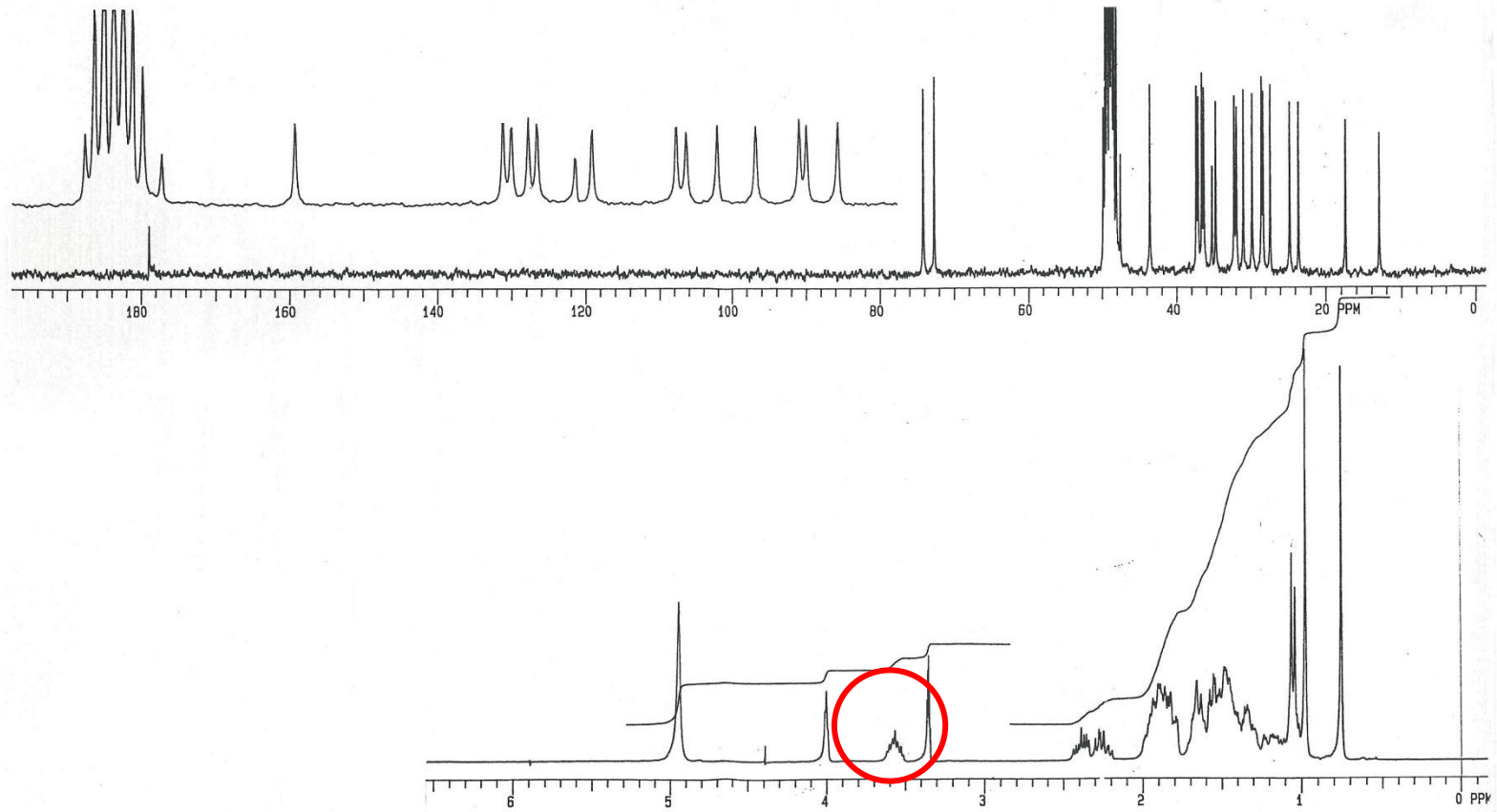
**Anexo 4. Placas cromatográficas de cepas de actinomicetos.**

CEPAS	TIEMPO DE CONTROL	FOTOGRAFÍA DE LA PLACA
<p>MMAE-16A MMAE-16B MMAE-16C- MMAE-17A</p>	<p>48 horas</p>	



<p>MMAE-16D MMAE-17B MMAE-17C</p>	<p>48 horas</p>	
<p>MMAE-17D MMAE-18A MMAE-19A MMAE-19B</p>		
<p><b>PLACA EXPUESTA A LUZ UV</b></p>		

**Anexo 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido Desoxicólico.**



Anexo 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido 3-ceto-desoxicólico.

