

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

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

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

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LA
SAL SÓDICA DEL ÁCIDO HYODESOXICÓLICO POR PARTE DE
ACTINOMYCETOS AISLADOS DE MUESTRAS DE SUELOS DE LAS
PROVINCIAS DE PICHINCHA Y MORONA SANTIAGO**

AUTOR:

SEBASTIÁN FRANCISCO ESPINEL ALVAREZ

TUTORA:

MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

Yo, Sebastián Francisco Espinel Alvarez, con documento de identificación N° 0502791833, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico por parte de actinomycetos aislados de muestras de suelos de las provincias de Pichincha y Morona Santiago ”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Sebastián Francisco Espinel Alvarez.

CI: 0502791833

Quito, marzo del 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el Proyecto de Investigación: Evaluación de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido hydesoxicólico por parte de actinomicetos aislados de muestras de suelos de las Provincias de Pichincha y Morona Santiago, realizado por Sebastián Francisco Espinel Alvarez, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2016

(f) 
María Elena Maldonado Rodríguez.

CI: 1707743157

Dedicatoria

Dedico este proyecto en primera instancia a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para terminar este proyecto de investigación. A mis padres, que me han dado la vida, pilares fundamentales que han velado por mi bienestar siendo mi apoyo en todo momento, depositando su confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. A mi novia, compañera inseparable de cada lucha, quien representó gran esfuerzo, paciencia y perseverancia en momentos de decline y cansancio. A mis abuelos y hermanos que me han dado su ayuda incondicional, al Ing. Ramiro Oviedo de la manera más atenta expreso mi gratitud por brindarme la oportunidad abriéndome las puertas en el campo laboral y por ultimo agradezco a cada una de las personas que fueron parte del arduo proceso de mi formación, por brindarme el apoyo y la guía que necesité para culminar este primer gran paso de mi futuro profesional. Es por ellos que soy lo que soy ahora.

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 por compartirme su invaluable conocimiento durante el desarrollo de mi trabajo, y por su colaboración, paciencia y apoyo, pero sobre todo por esa gran amistad incondicional brindada.

Al Dr. Luis Valdes por brindarme su apoyo incondicional en el proceso de graduación.

Al personal del laboratorio Ciencias de la Vida, 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 compañeras tesisistas, quienes colaboraron en el proceso de investigación.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.....	4
1.1. Esteroides.....	4
1.1.1. Tipos de esteroides	5
1.2. El colesterol	5
1.3. Ácidos biliares	6
1.3.1. Ácidos biliares presentes en la bilis.....	8
1.3.2. Síntesis de ácidos biliares	8
1.4. Ácido hyodesoxicólico y función.....	9
1.5. Ácido ursodesoxicólico y aplicaciones.....	10
1.5.1. Litiasis biliar (cálculos biliares de colesterol).....	11
1.5.2. Tratamiento con ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico.....	12
1.6. Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	12
1.6.1. Silica gel y alúmina	12
1.6.2. Reveladores.....	13
1.7. Resonancia Magnética Nuclear	13
1.8. Actinomycetos	14
1.8.1. Características de los Actinomycetos.....	14
1.8.2. Géneros de Actinomycetos	15
1.8.3. Aplicaciones.....	16
1.8.3.1. Ambientales	16
1.8.3.2. Industriales.....	16
1.9. Biotecnología	18
1.9.1. Aspectos Generales	19

1.9.2.	Biotecnología en Ecuador.....	19
1.9.3.	Biotransformación	20
1.10.	Identificación de microorganismos	22
1.10.1.	Pruebas bioquímicas.....	23
1.10.2.	Caracterización fenotípica de microorganismos.....	24
1.10.2.1.	<i>Fundamento de la tinción de Gram</i>	24
	Capítulo 2.....	25
2.1.	Fase I: Muestreo.....	25
2.1.1.	Delimitación de la zona de muestreo.....	26
2.1.1.1.	<i>Provincia de Morona Santiago</i>	26
2.1.1.2.	<i>Provincia de Pichincha</i>	29
2.1.2.	Selección de áreas específicas de muestreo.....	30
2.1.3.	Materiales y métodos para el muestreo	32
2.2.	Fase II. Aislamiento y purificación	33
2.2.1.	Preparación de diluciones	33
2.2.2.	Cultivo en medio sólido	34
2.3.	Fase III. Screening microbiológico.....	35
2.3.1.	Preparación del Caldo de Cultivo ATT	35
2.3.2.	Siembra de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico.....	36
2.3.3.	Preparación de la muestra para el análisis por CCF	36
2.3.4.	Escalamiento del cultivo.....	37
2.4.	Fase IV: Análisis mediante RNM	38
2.4.1.	Extracción del compuesto a identificar.....	38
2.4.2.	Placa Preparativa.....	39
2.4.3.	Identificación del compuesto.....	40

Capítulo 3.....	41
3.1. De la selección de las zonas de muestreo.....	41
3.2. Del aislamiento y purificación de Actinomyces	42
3.3. Del Screening de la capacidad de biotransformación de los Actinomyces aislados	44
3.4. De la selección de las cepas con máxima capacidad de biotransformación	49
3.5. De la interpretación de los espectros.....	52
3.6. De la identificación de la cepa MMAE-21B.....	53
Conclusiones	54
Recomendaciones	55
Referencias.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Contenido de ácidos biliares en la bilis de diferentes animales.	10
Tabla 2. Ubicación de la localidad camal de Sucúa.	27
Tabla 3. Ubicación de la localidad Granja Sevilla Don Bosco.	28
Tabla 4. Ubicación del río Machángara.	29
Tabla 5. Áreas específicas de muestreo.	31
Tabla 6. Cepas de Actinomycetos aisladas según su lugar de procedencia.	43
Tabla 7. Referencia del porcentaje de biotransformación	45
Tabla 8. Biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico. Río Machángara.	46
Tabla 9. Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico	47
Tabla 10. Porcentaje de Biotransformación de cada cepa aislada	50
Tabla 11. Porcentajes de biotransformación en el escalamiento del cultivo.	51

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del núcleo esteroideo básico	4
Figura 2. Esteroides de la serie 5α	7
Figura 3. Esteroides de la serie 5β	7
Figura 4. Estructura de los ácidos biliares primarios: cólico y quenodesoxicólico ...	9
Figura 5. Estructura del ácido biliar hyodesoxicólico	9
Figura 6. Estructura molecular del ácido ursodesoxicólico	11
Figura 7. Ubicación en el Camal de Sucúa	27
Figura 8. Ubicación de la Granja Sevilla Don Bosco	28
Figura 9. Ubicación del Río Machángara	29
Figura 10. Bandas y raspado de placa preparativa.	39
Figura 11. Gráfica de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico por Actinomycetos, representada en porcentaje	49
Figura 12. Placa Cromatográfica	51
Figura 13. Estructura química del ácido hyodesoxicólico.....	53
Figura 14. Estructura Química del 3-ceto-hyodesoxicólico (8 mg, 4%)	53

Índice de anexos

Anexo 1. Ficha técnica Columbia Agar e Indicaciones para la preparación del producto deshidratado.....	62
Anexo 2. Componentes del medio líquido ATT.....	63
Anexo 3. Fotos del muestreo y cepas aisladas de actinomycetos	64
Anexo 4. Procedimiento Screening de la capacidad de biotransformación	66
Anexo 5. Placas cromatográficas de cepas de actinomycetos	67
Anexo 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido Hyodesoxicólico	68
Anexo 7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido 3-ceto-hyodesoxicólico	69

Resumen

Los actinomicetos son el segundo grupo de microorganismos más abundantes, se encuentran en: suelos, aguas estancadas, ambientes contaminadas y otros. Están considerados dentro del límite entre bacterias y hongo, poseen características, morfológicas y reproductivas muy similares a ambos grupos de microorganismos. En gran parte son microorganismos Gram-positivos, en ocasiones resistentes a la penicilina. Participan activamente en la producción de antibióticos, azúcares complejos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores, compuestos antiparasitarios y en la descomposición de compuestos orgánicos, por tal motivo, seleccionados para el estudio de la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido biliar hyodesoxicólico, con interés industrial. El desarrollo de técnicas como la Cromatografía en Capa Fina (CCF) y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permitieron el control del proceso biotransformativo, encontrando como producto final al ácido 3-ceto-hyodesoxicólico. Aplicando la técnica de Tinción Gram se comprobó que los Actinomicetos muestreados pertenecen al grupo de las bacterias Gram-positivas.

Palabras clave: biotransformación, actinomicetos, sal sódica del ácido hyodesoxicólico.

Abstract

Actinomycetes are the second most abundant group of microorganisms found in: soil, stagnant water, contaminated environments, etc. They are considered within the boundary between bacteria and fungus, they have characteristics, morphological and reproductive very similar to the two groups of microorganisms. Are largely Gram-positive microorganisms sometimes resistant to penicillin. Active in the production of antibiotics, complex sugars, antitumor agents, immunosuppressive agents, antiparasitic compounds and decomposition of organic compounds, for that reason, selected for the study of the capacity of biotransform hyodeoxycholic the sodium salt of bile acid, with interest Industrial. The development of techniques such as thin layer chromatography (TLC) and nuclear magnetic resonance (NMR) allowed biotransformation control process, finding final product as 3-keto-hyodeoxycholic acid. Applying the Gram staining technique was found that the sampled Actinomycetes belonging to the group of Gram-positive bacteria.

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

Introducción

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. Estudios posteriores señalan que microorganismos pertenecientes al género *Proactinomyces*, son capaces de degradar parcialmente moléculas de colesterol (Fernández E. , 2013, p. 24).

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas que poseen un esqueleto esteroide. Se forman a partir de la molécula de colesterol en los hepatocitos (Vaquero, 2013, p. 10). Su principal función es la emulsión de los lípidos, facilitan la absorción en el intestino de vitaminas liposolubles y la digestión de triglicéridos de la dieta, además sirven como vía de eliminación de toxinas, carcinógenos, fármacos (Boyer & Nathanson, 1991, pp. 551-566). El ácido ursodesoxicólico, es el resultado de la 7β epimerización del ácido quenodesoxicólico por las bacterias del colón (Álvarez F. , 2008, p. 128), tiene un efecto estabilizador sobre las membranas del hepatocito junto con el efecto colerético (Fernández, Guzmán, & Herrera, 2004, p. 339) y promueve la disolución de cálculos vesiculares de colesterol (Leza, et al., 2008, p. 581), se encuentra naturalmente en la bilis de los osos, utilizado como hepatoprotector en la medicina tradicional asiática, el ácido cólico es la principal materia prima usada para la síntesis del ácido ursodesoxicólico, obtenido a partir de un proceso de síntesis química. En adultos es empleado para patologías como: litiasis biliar, cirrosis biliar primaria, colestasis del embarazo, hepatitis alcohólica, hepatitis crónica autoinmune, hepatitis virales, (Romero & Sotelo, 2006, p. 69) su uso ha logrado disolver cálculos vesiculares de tipo arenosos (Mamianeti, 1999, p. 200). La síntesis de moléculas complejas de esteroides requiere de reacciones específicas,

el uso de microorganismos permite el desarrollo de reacciones de alta estereo selectividad. La gama de sustancias farmacológicas se puede aumentar mediante la biotransformación de moléculas complejas, mediado por células de microorganismos designados como agentes catalizadores de reacciones de conversión de moléculas orgánicas afines (intermediarias o precursoras) obteniendo otras biológicamente activas (Ramirez, Manjarrez, Perez, Solis, & Luna, 2009, pp. 5-11), destacando los actinomicetos que poseen la capacidad de producir importantes compuestos activos (Soler, 2012, p. 55).

En el presente trabajo de investigación, el objetivo fue aislar y seleccionar microorganismos pertenecientes al grupo actinomycetos provenientes de las provincias de Pichincha y Morona Santiago, con capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido Hyodesoxicólico. La identificación de algunos metabolitos resultantes de la biotransformación mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas, es de gran interés en la recuperación de productos de la síntesis química de estos.

El ácido ursodesoxicólico que es sintetizado químicamente, es el principio activo que se utiliza a nivel farmacéutico por sus propiedades de solubilización de cálculos biliares arenosos de colesterol. La síntesis química implica una serie de reacciones, la mayoría de las cuales consisten en oxidaciones y reducciones, que tienen un fuerte impacto ambiental (Maldonado, 2013, pág. 31). Por ejemplo, por vía química la hidrólisis de los ácidos biliares, que en la bilis se encuentran en forma conjugada con glicina y taurina, se obtiene con el uso de altas concentraciones de NaOH, además la síntesis química del ácido ursodesoxicólico genera una alta cantidad de productos de desecho que implica altos costos para su eliminación conjuntamente con las sales de cromo y disolventes orgánicos. La necesidad de metodologías alternativas para la obtención de ácido ursodesoxicólico y ácido quenodesoxicólico, se ha enfocado en la biotransformación con microorganismos

no patógenos. La reacción de deshidroxilación en procesos biotecnológicos, es común en los microorganismos que puedan trabajar en biotransformaciones. En los ácidos biliares la deshidroxilación permite biotransformar ácidos biliares primarios (ácido cólico y ácido quenodesoxicólico), para producir los ácidos biliares secundarios (ácido litocólico y ácido desoxicólico), considerados para obtener compuestos de partida útiles para la síntesis de otros esteroides (Costa, 2013, págs. 18-27).

Este trabajo experimental está enfocado en comprobar si los actinomicetos aislados poseen o no la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido hyodesoxicólico, componente principal (40% en peso) de la bilis porcina, que es un producto residual de la síntesis química del ácido ursodesoxicólico.

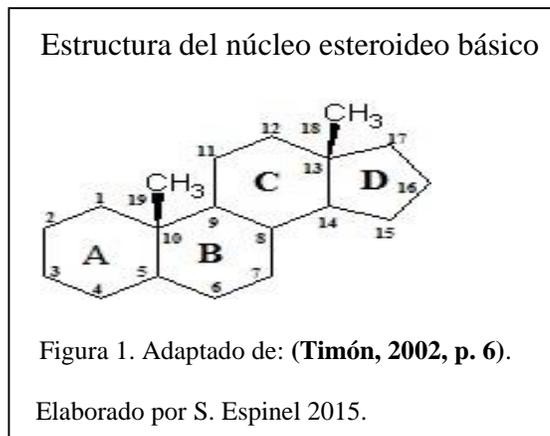
Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Esteroides

Los esteroides son lípidos insaponificables, derivados de un núcleo fundamental formado por los tres anillos de un fenantreno hidrogenado y un ciclopentano; son por lo tanto derivados de un cicloalcano tetracíclico conocido como el ciclopentano-perhidro-fenantreno, este se compone de carbono e hidrógeno formando 4 anillos fusionados, tres hexagonales y uno pentagonal, que poseen en total 17 átomos de carbono (Yufera, 1995, pp. 947-948).

El nombre general *esteroides* se introdujo en 1936, siendo todos ellos alcoholes secundarios tetracíclicos (Timón, 2002, p. 6).



El término esteroide procede de colestерina que viene del vocablo griego kholé (bilis) y stereós (duro/sólido), identificado por primera vez a inicios del siglo XVIII para designar a la materia cristalizada a raíz de los cálculos biliares humanos, descubierto en 1815 por Michel Chevreul, esta sustancia a fines del mismo siglo fue reemplazado por el nombre de colesterol, después de encontrar un alcohol en su estructura. Acto seguido cuando descubrieron diferentes compuestos de estructura similar al colesterol, todos fueron

denominados esteroides, que no relacionan a una actividad biológica en particular, apuntando a toda molécula que posea tres anillos de 6 carbonos y un anillo de 5 carbonos (Álvarez D. , 2009, pp. 3-4).

Las desigualdades por más pequeñas que sean, en los grupos funcionales unidos a los anillos pueden dar como resultado grandes diferencias en la función de los esteroides (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008, p. 46). La modificación selectiva en su estructura promete descubrir nuevas actividades biológicas con una alta gama de aplicaciones en los campos: farmacéutico, agroalimenticio y cosmético (Maldonado, 2013, p. 92).

1.1.1. Tipos de esteroides

Los esteroides tienen sustituyentes metilos sobre los carbonos 10-13 y una cadena lateral sobre el carbono 17 dando una gran variedad de posibles esqueletos carbonados, estos se pueden clasificar en función del número de átomos de carbono en estranos (18 carbonos), androstanos (19 carbonos), pregnanos (21 carbonos), colanos (24 carbonos) y colestanos (27 carbonos) (Dansey, 2012, p. 3).

1.2. El colesterol

El colesterol es un compuesto esteroideal correspondiente al grupo de los esteroides, carecen de funciones acidas como los grupos carbonilo y carboxilo. Este se encuentra presente en todos los tejidos animales, pero en especial en el tejido nervioso, es un componente fundamental de las membranas celulares, que regula la fluidez y es el precursor de hormonas esteroideas. Se almacena y se transporta en sangre en forma de lipoproteínas plasmáticas. También es un componente normal de la bilis y se encuentra en muchos cálculos biliares (Koolman & Röhm, 2004, p. 56).

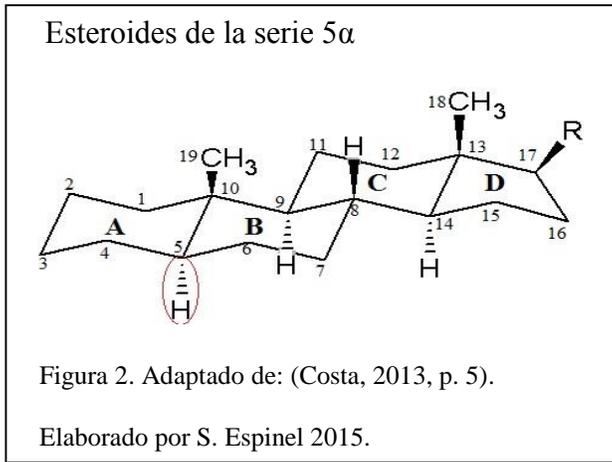
1.3. Ácidos biliares

La bilis es sintetizada por el hígado y secretada en los conductos biliares, donde se almacena en la vesícula biliar. En los seres humanos, la vesícula biliar se encuentra debajo del borde frontal del lóbulo derecho del hígado y su función es acumular y concentrar la bilis. Los ácidos biliares se forman en el hígado a partir del colesterol y están presentes en la bilis como una micela en solución, que favorece a la degradación de los lípidos en el intestino delgado (Koolman & Röhm, 2004, p. 56).

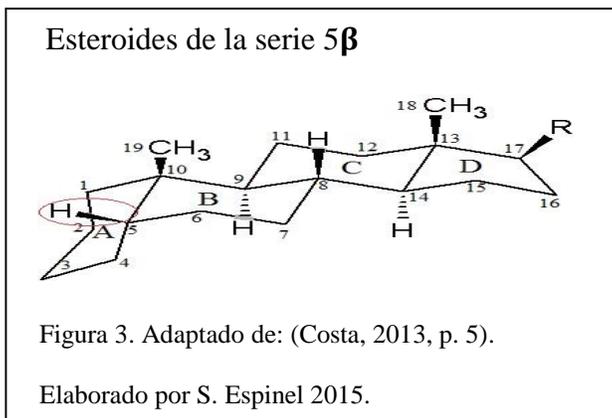
Los ácidos biliares se producen a partir del colesterol por los hepatocitos y posteriormente, se conjugan a dos aminoácidos: glicina y taurina, a pH fisiológico (6,8 a 8) de la bilis y los ácidos biliares intestinales, se encuentran en la forma disociada y por esta razón son llamados también sales biliares. Siendo los productos finales del metabolismo de hepatocitos de colesterol, se clasifican como esteroides. Los ácidos biliares tienen la estructura base del ciclopentano-perhidrofenantreno-polihidroxilada.

En la molécula esteroide los grupos metilo enlazados a C-10 y C-13, corresponden a C-19 y C-18, angulares y son perpendiculares al plano medio de la molécula. En los esteroides los grupos, que se encuentran en el mismo lado de los metilos angulares están indicados como sustituyentes β , mientras que los que están en el lado opuesto están nombrados como α sustituyentes. Están constituidos por cuatro carboxilos condensados o fusionados, denominados A, B, C y D, que presentan varias sustituciones. Los anillos A, B y C de los esteroides tienen una conformación de silla y mientras las uniones de los anillos B, C y D son siempre *trans* (en *trans* los hidrógenos en C-8 y C-9 y el metilo en C-13 y el hidrógeno en C-14), la unión entre los anillos A y B pueden ser *cis* o *trans*. El

hidrógeno en C-5, en el caso de unión *trans* (Figura 1) entre los anillos A y B, se orienta hacia abajo: este tipo de conexión se identifica con el prefijo 5α .



La estructura 5β presenta una estructura en *cis* (Figura 2) entre el anillo A y B y el hidrogeno en C-5 siempre se encuentra al lado de los metilos angulares.



Los ácidos biliares son estructuras con 24 átomos de carbono de la serie 5β (Álvarez M. , 2007, pp. 18-20). Los mismos son los productos finales de la utilización del colesterol. La asociación de sales biliares, lecitina y colesterol se denominan micelas mixtas, las mismas tienen la capacidad de solubilizar lípidos. El colesterol es una molécula insoluble en agua, por esta razón la presencia de las sales biliares y lecitina en la bilis es fundamental para mantener en disolución el colesterol, también son responsables de la solubilización de vitaminas y pueden actuar como hormonas enlazando receptores nucleares y

consecuentemente modulando la expresión de proteínas que repercuten en la homeostasis del colesterol (Álvarez M. , 2007, pp. 63-65).

1.3.1. Ácidos biliares presentes en la bilis

Los principales componentes de la bilis son: sales biliares (68%), lecitina (22%), colesterol libre (4%), proteínas (4,5%) y bilirrubina (0,3%) (Segarra, 2006, pág. 103).

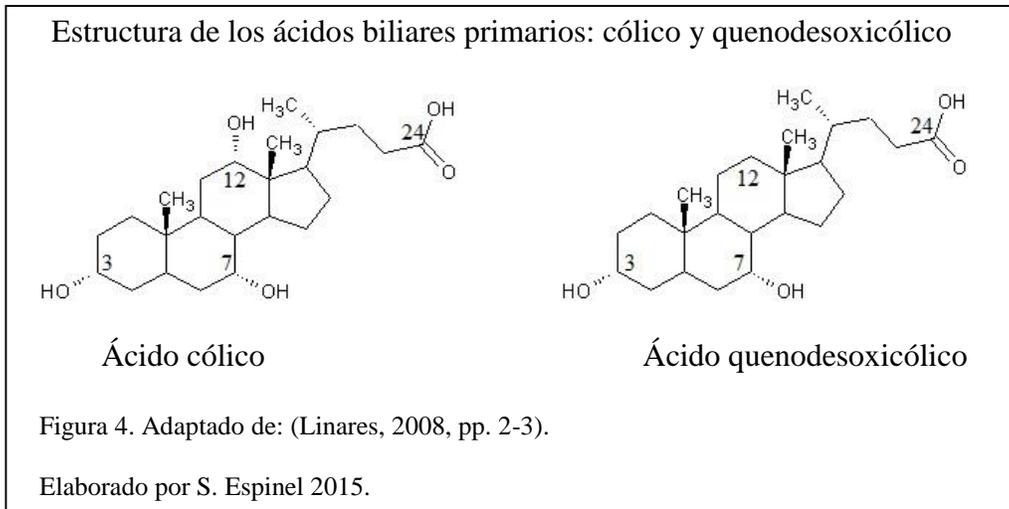
Según Antelo (2008, p. 209) las principales sales biliares destacan:

Litocolato sódico (hidroxilado en la posición 3α), quenodesoxicolato sódico (hidroxilado en la posición 3α y 7α), ursodesoxicolato sódico (hidroxilado en la posición 3α y 7β), desoxicolato sódico (hidroxilado en la posición 3α y 12α), glicodesoxicolato sódico (hidroxilado en la posición 3α y 12α), taurodesoxicolato sódico (hidroxilado en la posición 3α y 12α), colato sódico (hidroxilado en la posición 3α , 7α y 12α), ursocolato sódico (hidroxilado en la posición 3α , 7β y 12α), glicolato sódico (hidroxilado en la posición 3α , 7α y 12α), taurocolato sódico (hidroxilado en la posición 3α , 7α y 12α).

1.3.2. Síntesis de ácidos biliares

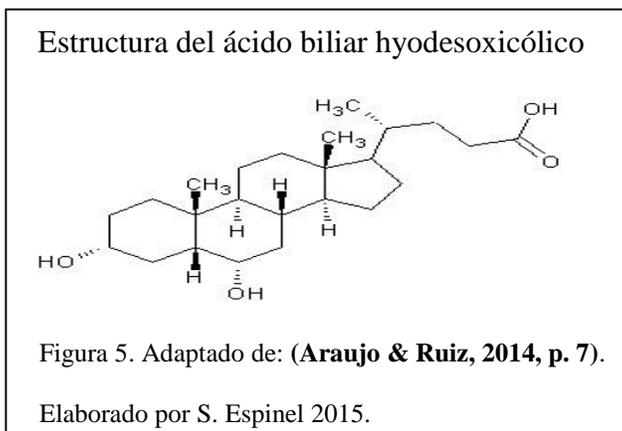
Se denominan ácidos biliares primarios a los sintetizados en los hepatocitos a partir del colesterol en el hígado. Los principales son el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico, los mismos que se convierten en sales biliares primarias mediante la conjugación con la glicina y la taurina. La mayor parte se reabsorben en el intestino delgado (Segarra, 2006, pp. 103-104).

En el intestino, una fracción (10-15%) de las sales biliares ingresa al colon, donde es desconjugada por la flora microbiana, dando origen a los ácidos: cólico y litocólico a partir del ácido quenodesoxicólico. Inmediatamente se produce la epimerización del oxidrilo de la posición C7 del ácido quenodesoxicólico para formar el ácido ursodesoxicólico (Beltrán, 2015, pág. 11).



1.4. Ácido hyodesoxicólico y función

Ácido hyodesoxicólico, también conocido como 3 α , 6 α ácido-dihidroxi-5 β -colan-24-oico o HDCA, es un ácido secundario de los ácidos biliares, es uno de los subproductos metabólicos de las bacterias intestinales. El grupo 6 α - hidroxilo hace que el HDCA sea un ácido hidrófilo (Roda, Roda, & Hofman, 1999).



El ácido hyodesoxicólico o HDCA está presente en mamíferos, dependiendo de la especie en diferentes proporciones. Es el constituyente principal de la bilis del cerdo, utilizado industrialmente como precursor para la síntesis de esteroides (Roda, Roda, & Hofman, 1999).

Tabla 1.

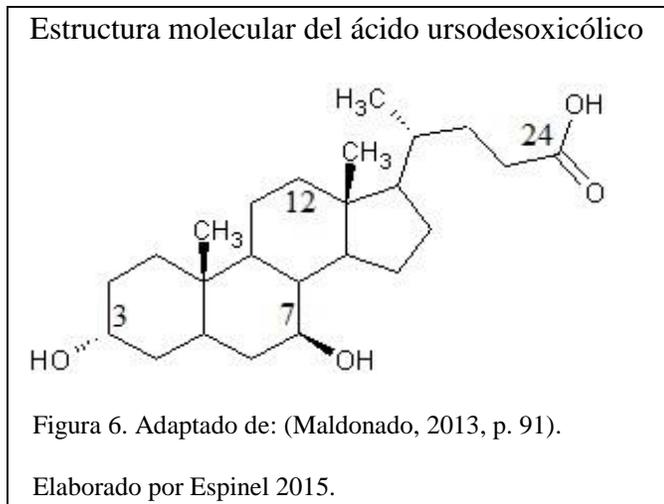
Contenido de ácidos biliares en la bilis de diferentes animales.

Bilis bovina	Bilis porcina	Bilis de pollo
Ácido cólico: 45-50%	Ácido hyodesoxicólico: 40%	Ácido cólico: 9%
Ácido quenodesoxicólico: 10-15%	Ácido quenodesoxicólico: 25- 30%	Ácido quenodesoxicólico: 85%
Ácido desoxicólico: 20%	Ácido hyocólico: 10%	

Nota: Adaptado de (Costa, 2013, p. 11). Elaborado por S. Espinel 2015.

1.5. Ácido ursodesoxicólico y aplicaciones

El ácido ursodesoxicólico se encuentra naturalmente en la bilis de los osos, utilizado para el padecimiento hepático y como hepatoprotector en la medicina tradicional asiática. Suprime la síntesis hepática, secreción y absorción intestinal de colesterol. Es utilizado para la disolución de cálculos biliares arenosos ricos en colesterol, presentes en pacientes con vesícula biliar funcional, y en la cirrosis biliar primaria (Acofarma, 2013, p. 1). Su estructura molecular está compuesta por 24 átomos de carbono y posee una hidroxilación en las posiciones C₃, C₇ y C₂₄ α.



1.5.1. Litiasis biliar (cálculos biliares de colesterol)

La litiasis biliar es la formación de cálculos en el interior de la vesícula biliar o de las vías biliares, por precipitación de la bilis y que según su localización en el tracto biliar se llama Colecistolitiasis o Coledocolitiasis, que es la presencia de cálculos en los conductos biliares (Arellanes, 1989, p. 1).

Los factores que intervienen en el origen de la litiasis biliar son: los hábitos alimentarios y composición de la dieta (alimentos ricos en colesterol y grasas animales), son las causas para originar cálculos biliares. Los factores que eluden el progreso de la litiasis biliar son: el consumo de proteína vegetal, de fibra y de café. El riesgo de cálculos biliares es propenso a desarrollarse en mujeres, sus causas se relacionan con: el tratamiento con anticonceptivos y estrógenos en la menopausia y los embarazos que pueda tener; sin embargo, en los hombres las circunstancias asociadas con el desarrollo de cálculos biliares son: el elevado contenido de triglicéridos, la diabetes mellitus, los bajos niveles séricos de colesterol, obesidad y pérdida de peso (Bastidas, Gonzalez, & Panduro, 2005).

1.5.2. Tratamiento con ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico

El ácido quenodesoxicólico (AQDC¹) tiene la capacidad de disminuir la concentración biliar de colesterol y la disolución de los cálculos. El ácido ursodesoxicólico (AUDC) al inhibir la enzima hepática hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA-R) o a la enzima esqualen sintetasa, disminuye la concentración de colesterol de la bilis (Soffer, 2000, pp. 140-141).

1.6. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La cromatografía en capa fina, es un procedimiento para separar mezclas de sustancias, identificando, caracterizando o determinando semi cuantitativamente los componentes individuales (Arcilla & Fernández, 2008, p. 14). Consiste en un proceso de separación de los componentes de una muestra, a través de la migración diferencial entre dos fases, una inmóvil o estacionaria y la otra que se mueve denominada móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o en un gel. Durante la separación, la fase estacionaria es atravesada por la fase móvil (líquida, gaseosa o fluido supercrítico) (Sharapin, 2000, p. 161).

1.6.1. Silica gel y alúmina

La silica gel o gel de sílice es una forma granular y porosa de dióxido de silicio fabricado sintéticamente a partir de silicato sódico, se utiliza para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa en la cromatografía. El gel de sílice (SiO₂) y la alúmina (Al₂O₃), son los adsorbentes más utilizados en fase estacionaria, ambos de carácter polar. El gel de sílice es usada para dividir sustancias polares (alcoholes, aminos,

¹ Esta investigación, señala al Ácido Quenodesoxicólico como AQDC y al Ácido Ursodesoxicólico como AUDC.

ácidos carboxílicos). La alúmina anhidra es usada para dividir sustancias apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas), debido a que es el que retiene con más fuerza a los compuestos. (Cannell, 1998, pág. 115)

1.6.2. Reveladores

Un revelador es una solución que se emplea para poner en evidencia la presencia de los componentes de la muestra, mediante reacciones que generan especies cromogénicas o fluorescentes (Villegas, Acereto, & Vargas, 2006).

Ácido fosfomolibdico: es un ácido basado en complejos de fósforo y molibdeno. Se presenta como un sólido amarillo inodoro a temperatura ambiente. Es utilizado para revelar compuestos terpénicos produciendo manchas oscuras (Patnaik, 2010, pág. 415).

Para el presente trabajo se lo utilizo en solución preparada con: ácido fosfomolibdico (15 g), ácido sulfúrico (15 g) y ácido acético (30 ml).

1.7. Resonancia Magnética Nuclear

La determinación estructural de moléculas de carácter orgánico, órgano metálico y biológico se lo realiza mediante la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Para ello es necesario la realización de diferentes tipos de experimentos de los cuales se obtiene una determinada información, como: espectro mono dimensional de H^1 ; espectro mono dimensional de C^{13} ; espectros bidimensionales homo nucleares; espectros bidimensionales hétero nucleares; 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. Cuando un núcleo se ubica en un campo magnético, tiene lugar una

interacción entre el momento magnético del núcleo y el campo, resultando en un desdoblamiento energético (Larraona & Manjavaca, 2008, p. 10).

Su aplicación más común, está orientada a las propiedades de los núcleos de hidrógeno y carbono. Porque los electrones producen modificaciones en los núcleos, efectos electrónicos, que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento (Elguero & Alkorta, 2006, p. 5).

1.8. Actinomycetos

Los Actinomycetos son microorganismos gram positivos (Serrano & Sandoval, 2005, pág. 16). Después de las bacterias, los Actinomycetos son los microorganismos más abundantes. Usan compuestos simples y complejos (ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos) como fuente de carbono. Participan en procesos, como la descomposición de los compuestos procedentes de plantas y animales, la degradación de proteínas, lípidos, almidón y quitina, la formación de humus y la fermentación del compost (Soler, 2012, p. 1).

1.8.1. Características de los Actinomycetos

Los Actinomycetos son morfológicamente heterogéneos y pueden formar filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales. Usan sustratos como la quitina y celulosa para su desarrollo y pueden sintetizar metabolitos bioactivos. (Hernández, 2008, p. 9).

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, p. 7).

La mayoría de los Actinomycetos son mesófilos, su crecimiento se registra entre un rango de temperatura de 25°C a 30°C, sin embargo, algunas especies termofílicas como *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.*, son capaces de crecer en temperaturas superiores a 55°C (Hernández, 2008, p. 9).

1.8.2. Géneros de Actinomycetos

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

- a) ***Streptomyces***: este género es uno de los géneros más conocidos de los actinomycetos. Poseen una morfología particular, donde se diferencian dos formas de crecimiento, una primaria o fase de latencia y una secundaria o fase exponencial. Son de interés biotecnológico porque producen metabolitos secundarios como los antibióticos.
- b) ***Nocardia***: es un género de microorganismos gram-positivos, pueden ser encontrados en suelos ricos de materia orgánica, así como en aguas o materia orgánica en descomposición, característicos de zonas templadas. Ciertas especies de *Nocardia*, son interés biotecnológico, porque producen antibióticos de interés industrial.
- c) ***Thermonospora***: se caracteriza por ser altamente sensible al calor. Un amplio rango de compuestos, incluyendo sustratos poliméricos, puede ser usado como fuente de carbono y energía.

1.8.3. Aplicaciones

La diversidad microbiológica que tiene la capacidad enzimática de ejecutar una gran cantidad de procesos tanto ambientales como industriales, siendo útiles en campos como la biorremediación y medicina.

1.8.3.1. Ambientales

Algunos actinomicetos han sido descritos como agentes de biocontrol debido a su capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras. Entre este grupo se encuentran microorganismos del género *Streptomyces* por ser capaces de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, como: *Alternaria sp.*, *Botrytis cinérea*, y *Rhizoctonia solani*. 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, p. 34).

1.8.3.2. Industriales

Según Vimal (2009, p. 1) 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.

Martínez & Moreno (2007, pp. 39-46) describen que los actinomicetos son ampliamente reconocidos por la capacidad de producir metabolitos secundarios, de uso farmacéutico y se describen a continuación:

- A. **Antibióticos:** hasta el año 1999, aproximadamente de 8000 reportes de antibióticos, el género *Streptomyces* representa el 45.6%, otros actinomicetos el 16%, otras bacterias el 16.9% y el 21.5% por hongos.
- I. Antibióticos β -lactámicos: *Streptomyces catleya* produce la tienamicina, antibiótico con acción contra gram-positivas y gram-negativas, bacterias aerobias y anaerobias.
- II. Aminoglucósidos: *Streptomyces griseus* produce la estreptomicina y *Micromonospora purpurea* produce la gentamicina, antibióticos de amplio espectro.
- III. Tetraciclinas: *Streptomyces rimosus* produce la oxitetraciclina y *Streptomyces aureofaciens* produce la tetraciclina y clortetraciclina. Estos compuestos actúan en la inhibición de síntesis proteica actuando sobre el nivel ribosómica 30S.
- IV. Macrólidos: *Saccharopolyspora erythraea* produce la eritromicina, que es un compuesto que actúa inhibiendo la síntesis proteica, específicamente se une a la subunidad ribosómica 50s.
- V. Polienos: *Streptomyces nodosus* produce la amfotericina B, que tiene acción antifúngica, actúa alterando la permeabilidad, cuando interfiere con los esteroides de membrana.
- VI. Glicopéptidos: *Amycolatopsis orientalis* y *Actinoplanes teichomyceticus* producen la vancomicina y teicoplanina, respectivamente.
- VII. Rifamicinas: Industrialmente *Amycolaptosis mediterranei* produce la rifamicina B y rifamicina SV, que actúan inhibiendo la síntesis de RNA al unirse a la RNA polimerasa.

- VIII. Fenicoles: El cloranfenicol, es un antibiótico aislado de *Streptomyces venezuelae*, su acción es inhibir la síntesis proteica de peptidiltransferasa uniéndose a la subunidad ribosómica 50s, bloqueando la formación del enlace peptídico.
- B. **Azúcares Complejos:** La lincomicina y su derivado clindamicina son antibióticos aislados de *Streptomyces lincolnensis*, su mecanismo de acción es inhibir la síntesis proteica de peptidiltransferasa uniéndose a la subunidad ribosómica 50s.
- C. **Agentes Antitumorales:** los siguientes compuestos: actinomicina D, mitomicina, bleomicina, neomicina y las antraciclinas, daunorubicina y doxorubicina son antibióticos producidos por actinomycetos usados para quimioterapia de tumores. La actinomicina D, con acción anticancerígena, es un antibiótico polipeptídico aislado de *Streptomyces*.
- D. **Agentes Inmunosupresores:** Los policétidos FK-506 (tacrolimus) y rapamicina (Sirolimus), son compuestos con actividad inmunosupresora, aislados de *Streptomyces tsukubaensis* y *Streptomyces hygroscopicus*, respectivamente.
- E. **Compuestos Antiparásitos:** los poliéteres monensina, los alócidos y salinomicina, son producidos por *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces lasaliensis* y *Streptomyces albus*, respectivamente.

1.9. Biotecnología

La biotecnología puede ser clasificada de acuerdo a su aplicación en importantes y amplias áreas, como son las más relevantes: industriales y ambientales.

1.9.1. Aspectos Generales

Según el *Convenio sobre la Diversidad Biológica*, artículo N° 2 (Naciones Unidas, 1992) se entiende por biotecnología a toda aplicación tecnológica, que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

Negrín y otros, (2007, p. 54) mencionan que la utilidad de la biotecnología está orientada a los principios de la ciencia y de la ingeniería de procesos, para hacer productos de valor para el hombre, con producción de bienes y servicios que llevan a la formación de un producto eficiente, económico y de seguridad.

El uso de procesos biotecnológicos es una auténtica innovación, por las distintas metodologías aplicables a resolver problemas de contaminación o desarrollar tecnologías productivas alternativas (Marín, Sanz, & Amils, 2005, p. 29).

La biotecnología es considerada una opción alterna en el descubrimiento de nuevas tecnologías que sustituyen materias primas altamente contaminantes, rediseñando el producto final y disminuyendo la producción de corrientes residuales relacionadas al proceso productivo (CAR/PL, 2003, p. 9).

1.9.2. Biotecnología en Ecuador

El Ecuador es uno de los países mega diversos a nivel mundial, presenta recursos importantes y estratégicos como es la biodiversidad, el agua, recursos del suelo y subsuelo, quienes brindan a los ecosistemas valores culturales, intelectuales, estéticos y espirituales en la denominada nueva economía, importantes para la sociedad, que hacen del país un sistema ecológico dinámico de considerables variaciones, siendo fuente de innumerables

nuevos agentes biológicos, microorganismos y sustancias con aplicaciones médicas, alimentarias e industriales, que son motivo de interés científico (Sánchez, 2014, p. 1).

Según Pro Ecuador (2013, pp. 5-14) el mercado consumidor interno del Ecuador está demandando progresivamente cada vez más productos y servicios de biotecnología avanzada, donde 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; principalmente para su aplicación en las ramas: agropecuaria, biorremediación, cuidado de la salud, producción de alimentos y biocombustibles, de las cuales destacan la agrobiotecnología y biorremediación por ser más desarrolladas en la concentración de actividades de investigación y provisión de servicios. 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%).

1.9.3. Biotransformación

La dinámica enzimática de los sistemas biológicos ha sido explotada por los seres humanos desde épocas muy remotas para la obtención de compuestos o materiales importantes. En las últimas décadas los desarrollos industriales y la necesidad de nuevos materiales con aplicaciones novedosas han potencializado el resurgimiento de algunas técnicas biotecnológicas ya conocidas y el desarrollo de otras más elaboradas que son consideradas como alternativas importantes de investigación, ya que posibilitan la obtención de un gran número de materiales especializados. Los procesos de biotransformación utilizan sistemas biológicos completos (organismos superiores, microorganismos, plantas, algas etc.) o sus partes (órganos, enzimas o células) para realizar modificaciones estructurales sobre compuestos exógenos. La aplicación

inmediata de las biotransformaciones radica en la obtención de compuestos quirales aplicables a la síntesis asimétrica de moléculas de interés comercial tales como: medicamentos, intermediarios farmacéuticos, aditivos para alimentos, agroquímicos, entre otros (Correa, 2009, pp. 22-24).

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, p. 27).

El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa a la aplicación de síntesis química, las enzimas de uso industrial en general se exponen a condiciones extremas, como altas concentraciones de sustrato, un pH y temperatura elevados (Romero, Mejía, & A, 2014, pág. 4).

Sin embargo, las enzimas puras desarrollan una alteración de la conformación respecto a su estado original, pierden su actividad enzimática durante la movilización y tienen un alto valor económico (Arroyo, 1998, págs. 23-39).

Por lo tanto, se da preferencia a los sistemas biológicos completos con lo que se favorece al crecimiento rápido en medios sencillos y económicos, a la formación de sistemas multienzimáticos, susceptibles de ser manipulados.

La biotecnología blanca, también llamada biotecnología industrial, es la aplicación de técnicas biotecnológicas para mejorar procesos industriales o crear nuevos procesos, explotando la capacidad de los microorganismos para transformar un sustrato de partida en un producto de interés industrial (Duque, 2010, p. 32).

La biotecnología roja se refiere a las aplicaciones biotecnológicas en las áreas de salud humana y animal. Incluye tecnologías como el diagnóstico molecular, la ingeniería

celular, nuevas moléculas terapéuticas de origen biotecnológico y la terapia génica, con énfasis en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, fundamentalmente cáncer. Algunos ejemplos son el desarrollo de medicamentos a través del diseño de organismos para producir antibióticos, los diagnósticos moleculares o las terapias regenerativas (Pliego, 2011).

1.10. Identificación de microorganismos

La identificación de un microorganismo puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de similitudes. Los procedimientos que permitan el aislamiento y selección de microorganismos a fin de tener éxito, con los métodos de selección deben constituir una actividad interdisciplinaria que combine actividades de: microbiología, química, bioquímica, ingeniería y bibliografía. El éxito de un programa de selección depende de la fuente utilizada para la obtención de los microorganismos y del método elegido para detectar la actividad deseada (Mateos, 2000, p. 13).

Como consecuencia del pequeño tamaño de los microorganismos, la información que se puede obtener acerca de las propiedades de cada micro-individuo es limitada, esta información se obtiene al hacer crecer microorganismos en condiciones definidas, como por ejemplo los cultivos de microorganismos, la esencia de este proceso la integran varias operaciones como: el aislamiento, que es la separación de un microorganismo determinado de una población; el cultivo, que es el crecimiento de poblaciones de microorganismos en ambientes artificiales (medios de cultivo) bajo condiciones de laboratorio; la identificación de microorganismos, que depende de la obtención de

cultivos puros mediante la utilización de técnicas de aislamiento y purificación (Roger, John, Mark, & Page, 1992, pp. 17-18).

Las aplicaciones de las técnicas de biología molecular en microbiología posibilitan la detección del material genético específico de cada microorganismo, de difícil crecimiento en cultivos o desarrollos tardíos (Stamboulian, 2006, pág. 1).

Según Herrera (2011, pág. 1), las técnicas del ADN recombinante son una herramienta, que permite clasificar a los organismos de acuerdo a su filogenia, mediante la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo, sin embargo los estudios del ARN 16S o 18S, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, diferenciando entre los distintos microorganismos, donde se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas de evolución.

1.10.1. Pruebas bioquímicas

Los ensayos bioquímicos utilizados, generalmente son pruebas simples, que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática (catalasas, coagulasas, decarboxilasas, deaminasas, ureasas, peroxidasas, entre otras.), grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, codificadas por el material genético del cromosoma microbiano, simplificando la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, proveen los reactivos listos para su uso, y son totalmente automatizables (Murcia, 2008, p. 1).

1.10.2. Caracterización fenotípica de microorganismos

El desarrollo de las pruebas fenotípicas habituales se fundamenta en la descomposición de algunos sustratos específicos y la observación de particularidades macroscópicas (colonias) y microscópicas (Tinción Gram) de los microorganismos (Soler, 2012, p. 29).

1.10.2.1. Fundamento de la tinción de Gram

La tinción es el procedimiento donde las moléculas de un colorante permiten cambiar el color de las células de los microorganismos, para adsorberse a una superficie.

En el año 1844 el bacteriólogo danés Christian Gram desarrolló, la técnica de tinción de Gram, el mismo describe que las bacterias se tiñen de forma distinta por las diferencias en la estructura de sus paredes celulares, basadas en la reacción a la tinción de Gram, y pueden dividirse en dos grupos, Gram-positivas y Gram-negativas. La pared celular del grupo de las Gram está constituido por una capa de peptidoglicano, para las Gram positivas, formada por una capa gruesa impermeable y está constituida del 80-90 % de peptidoglicano, provocando que el disolvente que se aplica (cristal violeta) quede atrapado dentro de la pared celular, para las Gram-negativas formada por una capa delgada incapacitada para la retención del cristal violeta y está constituida del 10-20% de peptidoglicano. El resultado de la tinción, posterior al desteñido las células Gram-negativas por efecto de su capa delgada son incoloras, por el cual se aplica un colorante de contraste de color rojo (safranina) para manifestar su presencia y como consecuencia las células se tiñen de color rojo, sin embargo, las células Gram-positivas por la contextura de su capa gruesa y capacidad para retener el cristal violeta se tiñen de color azul. (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009, p. 3).

Capítulo 2

Metodología

2.1. Fase I: Muestreo

Las zonas de muestreo fueron seleccionadas basándose en:

A. Ubicación de la zona de muestreo: las descripciones de los parámetros de selección de los puntos de las zonas de muestreo fueron seleccionados de acuerdo a varios aspectos como son:

- Exposición o contacto con residuos de faenamiento de ganado ovino, porcino y vacuno.
- Biodiversidad del área.
- Alto grado de contaminación.

De acuerdo a este criterio se tomaron las muestras en:

- I. Río Machángara, por su alto grado de contaminación, por una mala gestión de residuos orgánicos, donde las empresas dedicadas al faenamiento, vierten sus residuos directamente al río, generando una alta polución, donde es posible encontrar pocas especies que son especialistas en metabolizar moléculas específicas.
- II. La granja Sevilla – Don Bosco: por la alta biodiversidad microbiológica, donde se desarrollan microorganismos, en lugares donde se acumula, residuos de fluidos de animales; fluidos que están en contacto con animales.

III. El Camal Sucúa: por la actividad dedicada a sacrificar animales, donde se procesan los residuos orgánicos, incluyendo la vesícula biliar, que contiene ácidos biliares.

Todas las muestras, posteriormente serán trasladadas a los laboratorios para su análisis respectivo.

B. Estado de la zona de muestreo: la descripción para cada zona de muestreo se detalla a continuación:

I. El río Machángara: contiene un alto grado de contaminación por ser el destino final de residuos de varios sitios de faenamiento.

II. La Granja Sevilla-Don Bosco: porque existe una biodiversidad microbiológica abundante, dando la posibilidad de localizar microorganismos con capacidad de metabolizar sustancias orgánicas.

III. El Camal Sucúa: por la presencia y acumulación de desechos de residuos orgánicos por incidencia del faenamiento y el proceso de gestión higiénica inadecuada.

C. Accesibilidad: las zonas de muestreo son sitios totalmente accesibles para aplicar las diferentes técnicas de muestreo que serán puestas en práctica.

2.1.1. Delimitación de la zona de muestreo

El muestreo se efectuó en las provincias de Pichincha y Morona Santiago. La ubicación de las zonas de cada una se describe en las siguientes tablas.

2.1.1.1. Provincia de Morona Santiago

La descripción de la ubicación del camal de Sucúa y la granja de Sevilla Don Bosco se describe a continuación en las siguientes tablas:

Tabla 2.

Ubicación de la localidad camal de Sucúa.

LOCALIDAD	UBICACIÓN
Zona Camal Sucúa	Establecimiento de faenamiento de reses. Ubicado al sur occidente de la ciudad de Macas, entre la Av. Sucúa y Kiruba. Coordenadas Geográficas: Latitud (x): -2,47. Longitud (y): -78.17

Nota: Elaborado por S. Espinel, 2015.



Tabla 3.

Ubicación de la localidad Granja Sevilla Don Bosco.

LOCALIDAD	UBICACIÓN
<p>Zona - Granja Sevilla Don Bosco.</p>	<p>Terreno rural dedicado a la cría de ganado, cerdos, aves, producción lechera. Ubicado en la parroquia Sevilla Don Bosco del cantón Morona perteneciente a la provincia Morona Santiago. Al margen izquierdo del Río Upano, frente a la ciudad de Macas</p> <p>Coordenadas Geográficas: Latitud (x): -2.31. Longitud (y): -78.10</p>

Nota: Elaborado por S. Espinel, 2015.

Ubicación de la Granja Sevilla Don Bosco

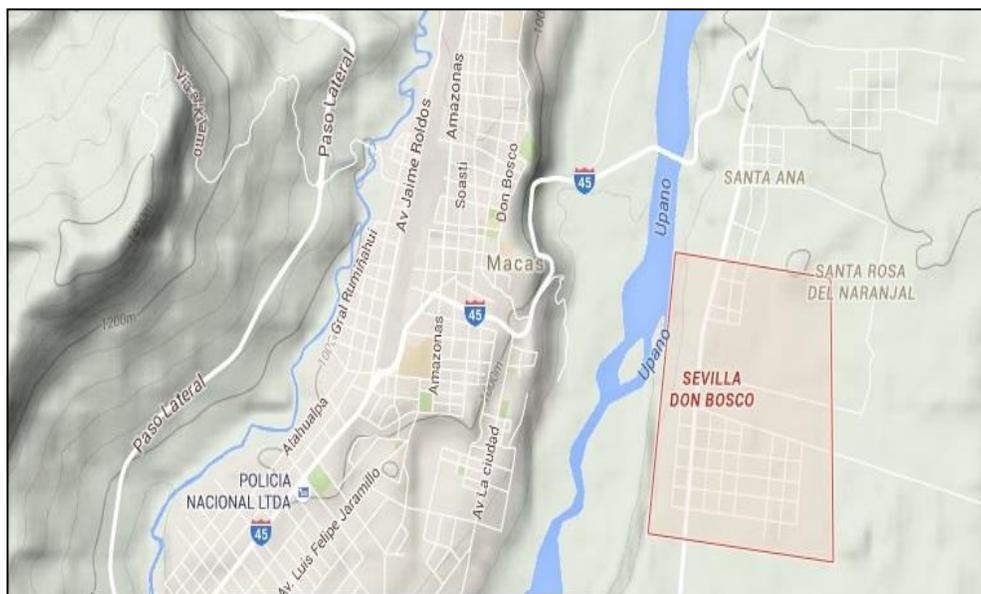


Figura 8. Fuente: Google Maps.

2.1.1.2. Provincia de Pichincha

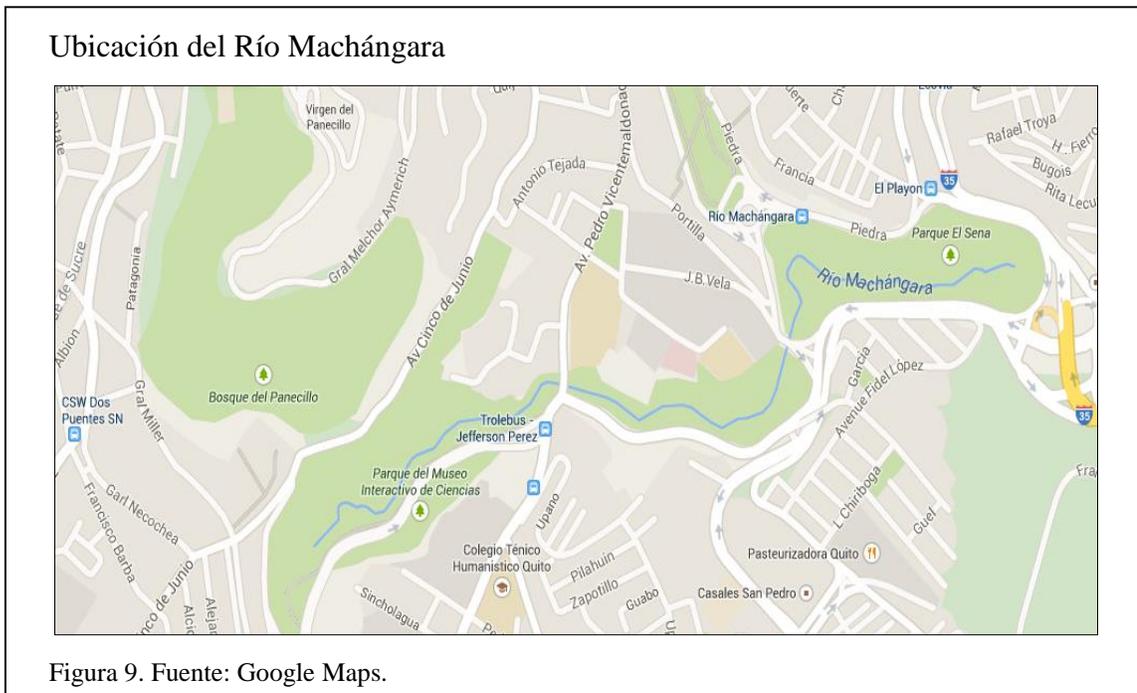
La descripción de la ubicación del río Machángara se describe a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 4.

Ubicación del río Machángara.

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

Nota: Elaborado por S. Espinel, 2015.



2.1.2. Selección de áreas específicas de muestreo.

- A. Camal de Sucúa: el muestreo fue seleccionado porque puede existir microorganismos actinomicetos que están en contacto con residuos, que tienen la capacidad de biotransformar moléculas específicas y que están adaptados a vivir en sitios con altas concentraciones de ácidos biliares como son: áreas de acumulación de líquidos residuales, producto del faenamiento de reses, depósitos de agua residual, canales de desagüe, depósitos de cabezas, patas y piel, recipientes con partes de estómagos de reses, mesones, pisos e instrumentos para el faenamiento; donde se acumulan productos residuales de ácidos biliares. Exposición o contacto con residuos de faenamiento de ganado ovino, porcino y vacuno
- B. Granja Sevilla-Don Bosco: la selección de las diferentes zonas se realizó en base a la probabilidad de encontrar microorganismos actinomicetos con capacidad de desarrollarse en zonas que están en contacto con fluidos animales, que tienen la capacidad de biotransformar moléculas específicas, y que están adaptados a vivir en sitios con ácidos biliares, como son: el establo de las reses, establo de cerdos, áreas de acumulación de depósitos de heces fecales de res y cerdos, desagüe de orina de los establos de res y cerdos, zona productiva lechera, estanque bebedero de agua de res y cerdos,
- C. Río Machángara: se seleccionó la zona a orillas del río en el Sector de Quitumbe porque existe un alto nivel de contaminación (zona turbia con circulación de residuos inorgánicos a su alrededor), que proviene de las industrias dedicadas al faenamiento, donde se acumulan productos residuales. Se delimitó 1 m² de superficie de río para tomar muestras.

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

Tabla 5.

Áreas específicas de muestreo.

Zona de muestreo	Descripción del área de muestreo
Río Machángara, parque (entrada)	Zona Fangosa
	Pocillo de agua estancada
	Fuente de agua estancada contaminada
	Creciente de la turbulencia del río
Río Machángara, salida del parque	Corriente ubicada antes de la entrada en la ciudad

Zona de muestreo	Descripción del área de muestreo
Camal Sucúa.	Vertedero de aguas procedentes de la depuración del sacrificio animal
	Vertedero de aguas procedentes de la depuración del intestino
	Pozo de agua con contenido del agua de lavado
	Superficie de lavado y recolección de intestinos
	Área de procesamiento del animal
Granja Sevilla Don Bosco.	Zona de depósito de heces fecales de res y cerdos.
	Zona de desagüe de la orina de los establos.
	Zona productiva lechera.
	Zona productiva lechera.
	Estanque bebedero de agua de res y cerdos.

Nota: Elaborado por S. Espinel, 2015.

2.1.3. Materiales y métodos para el muestreo

A. Muestreo en la Zona Sevilla-Sucúa: El material de muestreo está constituido por pipetas estériles, tubos de ensayo con 5 ml de solución fisiológica dentro del mismo. Para el muestreo se realizó el siguiente procedimiento:

- I. Se hace una observación de la zona.
- II. Se designan las aéreas convenientes para hacer el muestreo en función de los parámetros de selección.
- III. Se toma un tubo de ensayo con un hisopo y solución fisiológica estéril.
- IV. Se hace un hisopado de la superficie.
- V. Se regresa el hisopo al tubo de ensayo respectivo y se tapa para evitar contaminación.
- VI. Los tubos son transportados a una temperatura de 0-4 °C a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito, Campus El Girón, y son refrigerados a una temperatura de 4°C.

B. Muestreo en la ribera del río Machángara: Para el muestreo se realizó el siguiente procedimiento:

- I. Se hace una observación de la zona a las orillas del río.
- II. Se designan las aéreas convenientes para hacer el muestreo en función de los parámetros de selección.
- III. Se toma un tubo de ensayo con un hisopo y solución fisiológica estéril.
- IV. Se hace un hisopado de la superficie de las orillas del río.
- V. Se regresa el hisopo al tubo de ensayo respectivo y se tapa para evitar contaminación.

- VI. Los tubos son transportados a una temperatura de 0-4 °C a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito, Campus El Girón, y son refrigerados a una temperatura de 4°C.

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 recolectadas contenidas en tubos de ensayo de las respectivas zonas, se preparó una serie de diluciones que va desde 10^{-1} hasta 10^{-10} de acuerdo al siguiente procedimiento:

- I. Se prepararon 10 tubos de ensayo estériles con 9 ml 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} .
- II. En condiciones de esterilidad, se colocó 1 ml de muestra en el tubo marcado como 10^{-1} . Del mismo tubo se tomó nuevamente 1ml y se transfirió al siguiente tubo corresponde a la dilución 10^{-2} . Se agita y se procede de la misma manera hasta llegar al tubo que contendrá la dilución 10^{-10} .
- III. Se tomó 1 ml del tubo de la dilución 10^{-10} , y se colocó en una placa Petri, se codificó y se incubó la placa a 29°C durante 24 horas, se observó el crecimiento paulatino en cada una.
- IV. Se seleccionaron placas Petri que tengan como máximo 300 unidades formadoras de colonias (ufc), ya que a partir de estas muestras diluidas se obtienen colonias aisladas de actinomyces.

V. El mismo procedimiento se realizó para todas las muestras.

2.2.2. Cultivo en medio sólido

DB DIFCO Columbia Agar Base: el medio se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, indicado en anexos.

Para que el medio sea selectivo, se adicionó un complejo antibiótico denominado ACTINOMYCETE SELECTAB™, compuesto por metronidazol y ácido nalidíxico, exclusivo para el crecimiento de actinomicetos.

En cámara de flujo laminar, se prepararon cajas Petri con 20 mL de agar, se dejó enfriar para su solidificación y su uso posterior. Se tomó 1 ml de cada una de las diluciones preparadas anteriormente, y se sembró en la caja mediante el método de dispersión con una espátula de Drigalsky, donde se coloca 1 ml de dilución en el medio y se extiende el inóculo hasta cubrir toda la superficie de la caja. Se codificó cada caja tomando en cuenta el origen 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 paulatino 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-3

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

Con un asa de siembra de NICROMO (aleación Níquel y Cromo), se tomó una pequeña cantidad de una unidad formadora de colonia (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-19A) y se la almacena en refrigeración a 4°C hasta que se requiera su uso.

Para que la conservación de las cepas sea adecuadamente útil, se inocula cada cepa pura en tubos pico de flauta con 15 ml 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

Para realizar el Screening microbiológico es conveniente dividir a la fase en 3 sub-fases: cultivo en medio líquido denominado ATT (abreviatura para Actinomycetos), siembra de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico en medio líquido y cromatografía en Capa Fina (CCF).

2.3.1. Preparación del Caldo de Cultivo ATT

El medio líquido que se utilizó para el crecimiento de actinomycetos está diseñado para satisfacer los requerimientos de estos microorganismos, que es un medio preparado por el grupo de investigación del Prof. Alessandro Medici, de la Universidad de Ferrara. Para su preparación se utilizan los componentes indicados en anexos. Se mezclaron los componentes, cuyas cantidades están de acuerdo a la cantidad de medio que se desea preparar. Se calentó y se llevó a ebullición durante 1 minuto. Se colocaron 20 ml del medio en erlenmeyer's de 100 ml y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos a 1 atm.

En condiciones de esterilidad, a escala analítica, a los cultivos se les inoculó cada cepa, la misma que se rotuló con el código de la cepa que se le ha destinado. Se mantuvieron bajo agitación a 120 rpm, a temperatura controlada (29 ° C), durante 24 horas, para permitir el crecimiento.

2.3.2. Siembra de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico

Los cultivos que se mantuvieron en agitación, a temperatura controlada, durante 24 horas de incubación, posteriormente, se les añadió el sustrato, que fueron 400 µl de una solución de sal sódica de ácido hyodesoxicólico con una concentración de 20 ppm. Una vez colocada la sal, se continuó la incubación bajo las mismas condiciones.

2.3.3. Preparación de la muestra para el análisis por CCF

Después de 24 horas de colocar la sal del ácido biliar hyodesoxicólico en el cultivo, en tubos Eppendorf, con capacidad de 1 ml, se tomaron 300 µl de medio de cultivo de cada Erlenmeyer, 100 µl de ácido clorhídrico concentrado (HCl 37%) 1.0 M para acidificar el medio a pH de 2-3 y se extrajo con 300 µl de acetato de etilo (C₄H₈O₂), para favorecer la extracción del ácido biliar en acetato de etilo. Se agitó en vórtex y se observó la formación de 2 fases, la sobrenadante que contiene el acetato de etilo, que es la fase de interés.

Con un capilar se tomó la fase sobrenadante y se distribuyó aplicando por triplicado en cada punto de las placas cromatográficas de silica gel con factor de fluorescencia, junto a las muestras se sembró el estándar del ácido hyodesoxicólico como patrón de referencia, previamente a la introducción de la placa, en la cámara cromatográfica, se colocó: la fase móvil, compuesta de acetato de etilo (C₄H₈O₂), ácido acético (C₂H₄O₂) y ácido clorhídrico (HCl) 1.0 M, en proporción 70:30:2 respectivamente, un pedazo de papel absorbente del

mismo tamaño para favorecer la saturación de la atmósfera en la cámara, posteriormente se colocó la placa en la cámara de cromatografía y se corrió hasta antes de que el solvente llegue aproximadamente a un centímetro del borde superior de la placa; extraer la placa de la cámara, hacer una señal de referencia del avance del eluyente y dejar evaporar la placa en la Sorbona.

El revelado de las manchas se realizó dispersando el revelador de ácido fosfomolibdico con una bomba de vacío y un aspersor que cubrió la placa hasta tomar un color amarillento-verdoso. Posteriormente se calentó la placa en una plancha de calentamiento a una temperatura no mayor a 100°C durante 3 minutos. Se observaron las manchas del revelado de color verde-azulado, se registró fotográficamente las placas. Realizar el mismo procedimiento bajo las mismas condiciones cada 24 horas con las 53 cepas, para observar el avanza del proceso de biotransformación. Se detuvo el monitoreo de cada cepa a las 72 horas.

2.3.4. Escalamiento del cultivo.

Finalizada la biotransformación a escala analítica, se seleccionan las cepas, basándose en el criterio de su mayor capacidad de biotransformación, se prepararon Erlenmeyer's con 20 ml del medio de cultivo para cada microorganismo, a cada uno se inoculó una de las cepas seleccionadas, y se mantuvo bajo agitación a 120 rpm, a temperatura controlada (29 ° C), durante 24 horas, para permitir el crecimiento. La cepa obtenida, se añade a los 200 mL para el escalamiento del cultivo, y se incuba por 48 horas promedio, en agitación a 120 rpm y a una temperatura de 29°C, posteriormente se sembró 4 ml de una solución de 20 ppm de sal sódica del ácido hyodesoxicólico. El monitoreo por CCF se realiza bajo las mismas condiciones para esta fase del screening. Al finalizar la misma se seleccionó

la cepa con mayor capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido hydesoxicólico, se extrae el producto de reacción, se purifica los compuestos con placas de cromatografía preparativas y se analiza mediante resonancia magnética nuclear.

2.4. Fase IV: Análisis mediante RNM

La técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear es usada para la identificación, cuantificación de estructuras moleculares, composición de mezclas de compuestos sintéticos o biológicos.

2.4.1. Extracción del compuesto a identificar

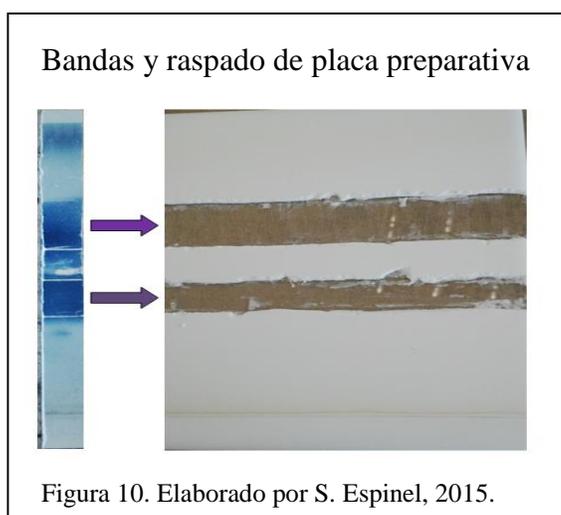
Seleccionada la cepa con mayor capacidad de biotransformación, se hace un escalamiento del cultivo y se realiza la extracción de los metabolitos, para lo cual se centrifugo en un tubo Falcon de un volumen de 50 ml, a 5000 rpm por 20 minutos, para separar las células bacterianas del medio de cultivo conteniendo los metabolitos del ácido biliar estudiado; el sobrenadante se separó a un embudo de separación y se adicionó HCl concentrado para acidificar el medio a pH de 2-3 y se extrajo con acetato de etilo. El producto de interés se recuperó después de 3 extracciones, eliminando las trazas de agua con la adición de sulfato de sodio anhidro. El producto obtenido se colocó en un balón, y se eliminó todo el solvente con un rota vapor modelo IKA RV10 BASIC, a una temperatura menor 40°C a 20 rpm. Posteriormente se registró el peso con la fracción total de los productos de la biotransformación que quedan después del proceso de evaporación.

2.4.2. Placa Preparativa

Se diluyó el producto que quedó en el balón con el mínimo volumen necesario a disolver la muestra 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 realizó la cromatografía utilizando la fase móvil: acetato de etilo ($C_4H_8O_2$), ácido clorhídrico (HCl) 1.0 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, para después repetir el proceso una segunda vez antes de revelar un pedazo de borde. La migración es lenta en placas preparativas. Se corren dos veces para mejorar la separación de los productos. De la placa totalmente seca, se recortaron 3 cm desde el borde izquierdo de la misma. Y se reveló este fragmento de PCF.

Utilizando una espátula se raspo la placa tomando como referencia la banda coloreada de la placa de muestra en la TLC revelada. Es importante el uso de mascarillas para evitar la inhalación del polvo de silica, porque es compuesto cancerígeno.

La siguiente figura muestra el raspado de la placa.



La silica recuperada del raspado de cada banda fue colocada un Erlenmeyer de 50 mL con máximo 3 ml de acetato. Se dejó en agitación durante 2 horas y, transcurrido este tiempo se filtra el Erlenmeyer. El étil acetato filtrado fue colocado en un frasco de vidrio pesado antes de su uso. En esta muestra se evaporó todos los rezagos de solvente con nitrógeno. 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 el análisis de 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.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. De la selección de las zonas de muestreo

Se concluye que la zona seleccionada para el muestreo de los microorganismos Actinomycetos fue la indicada, porque presentan las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos que cuentan con la habilidad de digerir sales biliares. Las aguas del río Machángara poseen un porcentaje alto de diversidad microbiana, porque el río es el destino final del depósito de los desechos orgánicos de industrias dedicadas al faenamiento. En el caso del muestreo de la Granja Sevilla-Don Bosco y en el Camal de Sucúa, en la Provincia de Morona Santiago, la carga microbiana obtenida fue elevada, debido a que la granja posee una gran biodiversidad microbiológica, donde se puede encontrar microorganismo capaces de biotransformar moléculas específicas, por otro lado el mal manejo de residuos y a las disposiciones finales de los desechos orgánicos, su resultado es la bioacumulación de residuos como los ácidos biliares, que son una fuente para el origen y desarrollo de Actinomycetos. En países subdesarrollados como es el caso de Ecuador, el tema ambiental es perjudicado en los camales municipales por la falta de equipos, infraestructura y la mala disposición final de los residuos; los mismos que generan compuestos orgánicos de fácil descomposición, produciendo efluentes, emisión de olores y residuos (Briceño & Castillo, 2009, pág. 1). Los niveles de contaminación de las aguas del río Machángara superan los estándares máximos permisibles. El resultado que se obtuvo para el río Machángara es corroborado por López (2009, pág. 31), quien menciona que el 75% del área urbana descarga sus aguas residuales en el Río Machángara, donde el mismo es fuente de descarga de 9 colectores

municipales que arrastran las aguas residuales de las actividades domésticas e industriales de la ciudad de Quito.

3.2. Del aislamiento y purificación de Actinomycetos

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

Tabla 6.

Cepas de Actinomycetos aisladas según su lugar de procedencia.

CÓD. CEPA	ORIGEN	CÓD. CEPA	ORIGEN
MMAE-1A	Río Machángara	MMAE-20B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-4A	Río Machángara	MMAE-21^a	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-6A	Río Machángara	MMAE-21B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-7A	Río Machángara	MMAE-21C	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-8A	Río Machángara	MMAE-21D	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-9A	Río Machángara	MMAE-22^a	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-10A	Río Machángara	MMAE-22B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-10B	Río Machángara	MMAE-22C	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-11A	Río Machángara	MMAE-22D	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-12A	Río Machángara	MMAE-23^a	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-13A	Río Machángara	MMAE-24A1	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-14A	Río Machángara	MMAE-24A2	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-15A	Río Machángara	MMAE-25^a	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-16A	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-25B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-16B	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-25C	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-16C	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-26B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-16D	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-26C	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-17A	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-26D	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-17B	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-29B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-17C	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-30^a	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-17D	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-30B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-18A	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-28^a	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-19A	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-28B	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-19B	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-28C	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-19C	Zona Sevilla-Sucúa	MMAE-29^a	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-19E	Zona Sevilla-Sucúa		

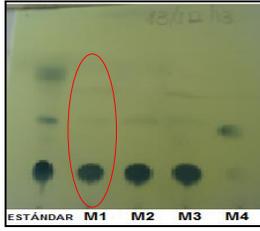
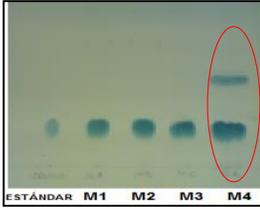
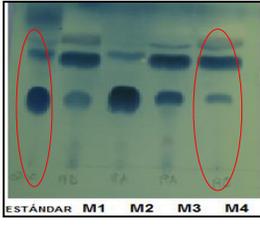
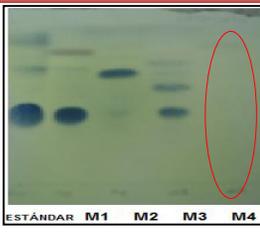
Nota: Elaborado por S. Espinel, 2015.

3.3. Del Screening de la capacidad de biotransformación de los Actinomycetos 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; en este análisis se utilizó como estándar de referencia el ácido hyodesoxicólico oxidado en la posición 3. Se consideran los siguientes rangos:

Tabla 7.

Referencia del porcentaje de biotransformación.

Imagen de referencia	Interpretación en porcentaje (%)
	<p>Rango de porcentaje de biotransformación desde 0-25%: 0-25%: se aprecia 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>Rango de porcentaje de biotransformación desde 25-50%: 25-50%: se aprecia 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>Rango de porcentaje de biotransformación desde 50-75%: 50-75%: se aprecia 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>Rango de porcentaje de biotransformación desde 75-100%: 75-100%: se aprecia 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>

Nota: Elaborado por S. Espinel, 2015.

Tabla 8.

Biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico. Río Machángara.

N°	Código microorganismo.	% de biotransformación del ácido hyodesoxicólico en función del tiempo (Horas).		
		24	48	72
41	MMAE-1A			25
42	MMAE-4A			
43	MMAE-6A	-	-	-
44	MMAE-7A	-	-	-
45	MMAE-8A			25
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: “-“: El microorganismo no presentó crecimiento. Los espacios en blanco indican que el microorganismo no biotransformó la sal.

Elaborado por S. Espinel, 2015.

Tabla 9.

Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico. Zona Granja

Don Bosco Sevilla-Camal Sucúa.

N°	Código Microorganismo.	% de biotransformación del ácido hyodesoxicólico en función del tiempo (Horas).		
		24	48	72
1	MMAE-16A			25
2	MMAE-16B		25	25
3	MMAE-16C		25	25
4	MMAE-17A	25	50	50
5	MMAE-16D			
6	MMAE-17B			
7	MMAE-17C			
8	MMAE-17D	25	25	50
9	MMAE-18A			
10	MMAE-19A	25	50	50
11	MMAE-19B	25	50	50
12	MMAE-19C	25	25	50
13	MMAE-19D			
14	MMAE-19E			25
15	MMAE-20B	25	50	50
16	MMAE-21A	25	25	25
17	MMAE-21B	25	50	50
18	MMAE-21C			
19	MMAE-21D			

20	MMAE-22A			
21	MMAE-22B			
22	MMAE-22C			
23	MMAE-22D			
24	MMAE-23A			
25	MMAE-24A1	25	25	25
26	MMAE-24A2	25	25	25
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		25	25
38	MMAE-29B			
39	MMAE-30A			

Nota: “-” : el microorganismo no presentó crecimiento. Los espacios en blanco indican que el microorganismo no biotransformó la sal. Se obtuvieron 17 cepas que actúan frente a la sal sódica del ácido hyodesoxicólico, lo que representa el 32% del total.

Elaborado por S. Espinel, 2015.

Gráfica de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico por Actinomycetos, representada en porcentaje.

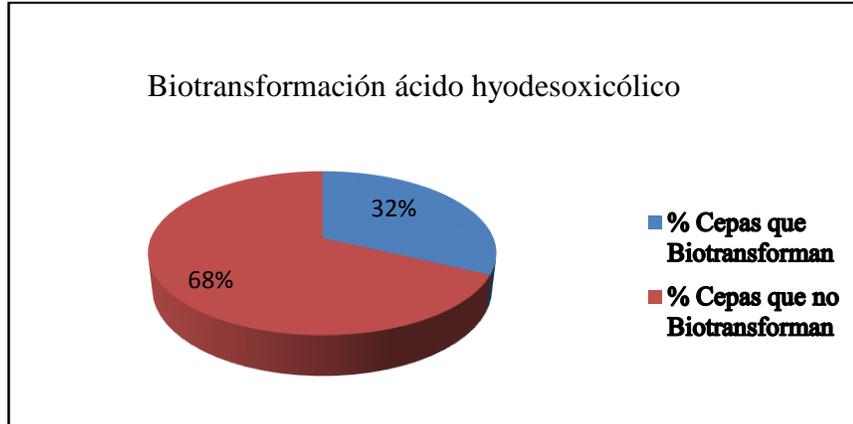


Figura 11. Elaborado por S. Espinel, 2015.

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

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de biotransformación de 9 cepas que actuaron en presencia de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico de un total de 17 cepas.

Tabla 10.

Porcentaje de Biotransformación de cada cepa aislada.

Código actinomicetos	Tiempo	Porcentaje de biotransformación de la sal del ácido hyodesoxicólico	Origen
16^a	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
16B	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
16C	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
17A	72H	50%	Zona Sevilla-Sucúa
17D	72H	50%	Zona Sevilla-Sucúa
19A	72H	50%	Zona Sevilla-Sucúa
19B	72H	50%	Zona Sevilla-Sucúa
19C	72H	50%	Zona Sevilla-Sucúa
19E	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
20B	72H	50%	Zona Sevilla-Sucúa
21A	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
21B	72H	50%	Zona Sevilla-Sucúa
24 A1	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
24 A2	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
29A	72H	25%	Zona Sevilla-Sucúa
1A	72H	25%	Río Machángara
8A	72H	25%	Río Machángara

Nota: Cepas que sí lograron biotransformar la sal sódica del ácido hyodesoxicólico.

Elaborado por S. Espinel, 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.

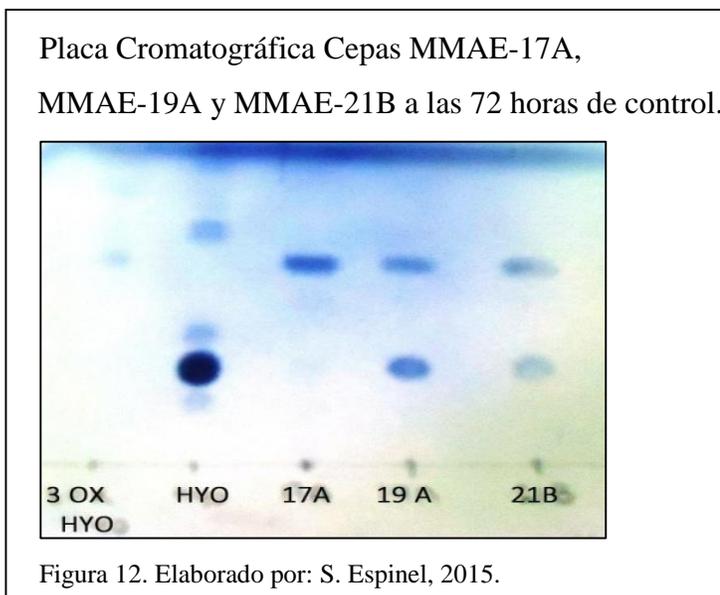
Tabla 11.

Porcentajes de biotransformación en el escalamiento del cultivo.

Código actinomicetos	Tiempo	Porcentaje de biotransformación de la sal del ácido hyodesoxicólico	Origen
MMAE-17A	72H	75%	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-19A	72H	75%	Zona Sevilla-Sucúa
MMAE-21B	72H	100%	Zona Sevilla-Sucúa

Nota: Elaborado por S. Espinel, 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 hyodesoxicólico oxidado en la posición C₃ y HYO: estándar el ácido hyodesoxicólico. Se observa que la cepa MMAE-21B presenta 2 manchas de las cuales, la más representativa es la que corresponde al ácido oxidado en C₃.

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-21B. El producto final de esta cepa fue extraído y se obtuvo que, a partir de 200 mg de la sal del ácido hyodesoxicólico. Después de 48 h, la cromatografía de la mezcla de reacción en una placa cromatográfica preparativa (eluyente acetato de etilo / n-hexano / ácido acético 70: 30: 2) que proporcionó el **ácido hyodesoxicólico** (20 mg, 5%) y el **producto** (8 mg, 4%) el cual, al ser analizado mediante la técnica ¹H-NMR fue identificado como **3-ceto-hyodesoxicólico**, producto de oxidación en C₃.

En el Anexo 8 se encuentran los datos espectroscópicos del **ácido hyodesoxicólico**: ¹H-NMR (CD₃OD) picos seleccionados δ: 0.75 (s, 3H-18), 0.97 (s, 3H-19), 1.00 (d, J = 6.0 Hz, 3H-21), 3.55 (m, 1H, H-3), 4.05 (m, 1H, H-6). En el **Anexo 9** se encuentran los datos espectroscópicos del **3-ceto-hyodesoxicólico**: ¹H-NMR (CD₃OD) cuyos picos seleccionados fueron δ: 0.75 (s, 3H-18), 0.97 (d, J = 7.0 Hz, 3H-21), 1.04 (s, 3H-19), 4.05 (m, 1H, H-6), en el anexo 8 se observa que hay el pico a 3,55 ppm (m, 1H, H-3) correspondiente al -OH ubicada en la posición del C₃ de la estructura del ácido hyodesoxicólico.

Estructura química del ácido hyodesoxicólico

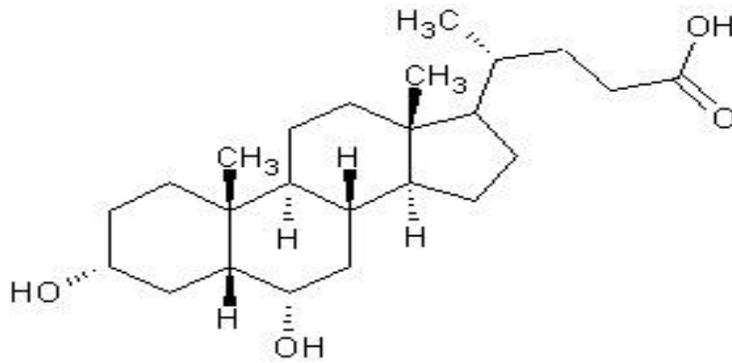


Figura 13. Elaborado por S. Espinel, 2015.

Estructura Química del 3-ceto-hyodesoxicólico (8 mg, 4%)

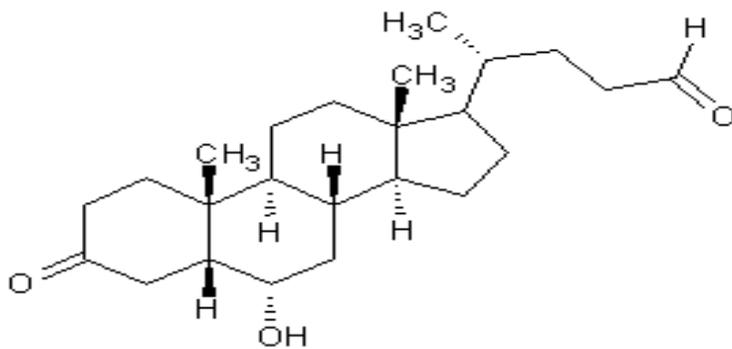


Figura 14. Elaborado por S. Espinel, 2015.

3.6. De la identificación de la cepa MMAE-21B

El resultado obtenido en base a la prueba de Tinción de Gram, indicó que la cepa MMAE-21B es un microorganismo Gram-positivo, confirmando una característica propia de los actinomicetos, como se referencia en la bibliografía según Serrano & Sandoval (2005).

Conclusiones

Las zonas de muestreo seleccionadas fueron las adecuadas para la obtención y aislamiento de actinomicetos, tomando en cuenta algunos criterios como son: En el río Machángara, provincia de Pichincha; por el alto índice de contaminación. La Granja de la Misión Salesiana en Sevilla-Don Bosco, provincia de Morona Santiago; los microorganismos que viven en zonas biodiversas pueden realizar funciones de descomposición y descontaminación de compuestos orgánicos. El Camal de Sucúa, provincia de Morona Santiago, por el incumplimiento de Buenas Prácticas en Gestión de Residuos.

De los sitios seleccionados para el muestreo de los microorganismos tanto en la provincia de Pichincha como de Morona Santiago se aislaron 53 cepas, de las cuales 17 tienen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido hyodesoxicólico, lo que representa el 32% de los actinomicetos aislados. De un total de 17 cepas, 9 biotransforman la sal sódica del ácido hyodesoxicólico, utilizando todo el carbono del mismo ácido, como fuente de energía con producción de dióxido de carbono. En base a los resultados obtenidos en la fase de screening se seleccionaron 3 cepas que presentaron un 75% de capacidad de biotransformación en un período de 72 horas, y son las cepas: MMAE-17A, MMAE-19A, MMAE-21B, con las que se procedió a realizar el escalamiento del cultivo.

La cepa MMAE-21B presentó un alto porcentaje de biotransformación (200 mg producto) de la sal sódica del ácido hyodesoxicólico, por tal motivo fue la cepa seleccionada para realizar el análisis del metabolito resultante de su biotransformación. Al analizar mediante la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), el metabolito producido por la cepa MMAE-21B se obtuvieron espectros claros, que permitieron determinar que el mismo corresponde al ácido 3-ceto-hyodesoxicólico, producto de oxidación en C₃.

Recomendaciones

Realizar la identificación de la cepa MMAE-21B, para estudios futuros de interés, porque es la cepa que presentó un mayor porcentaje de biotransformación.

Continuar la investigación de los productos de las cepas MMAE-17A, MMAE-19A, que presentan un alto rendimiento del proceso de biotransformación.

Realizar la conservación y preservación de actinomicetos cada 3 meses, para proceder con la renovación del cepario de los actinomicetos aislados.

La búsqueda de nuevos microorganismos en suelos que contengan residuos de ácidos biliares, posibilitará el descubrimiento de nuevas cepas de actinomicetos con capacidad de los mismos, con la característica de realizar el proceso de óxido/reducción en otras posiciones del carbono, con miras a obtener productos de interés en la industria farmacéutica, cosmética y agroalimentaria.

Actualmente no existen suficientes investigaciones del proceso enzimático de los Actinomicetos para degradar ácidos biliares, por tal motivo es fundamental realizar investigaciones dirigidas a identificar las enzimas que actúan en el metabolismo secundario de las cepas de Actinomicetos con un fin de producción a escala industrial.

El uso de técnicas moleculares permitirá identificar nuevos microorganismos, los cuales no ha sido posible identificación por técnicas tradicionales.

Referencias

- Acofarma. (2013). *Ficha de información técnica del Ácido Ursodesoxicólico*. Terrassa, Barcelona.
- Álvarez, D. (2009). *Universidad de Buenos Aires. Síntesis, actividad biológica y bases moleculares de acción de análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales*. Buenos Aires, Argentina.
- Álvarez, F. (2008). Tratamiento de la Colestasis crónica en niños. *Annales Nestlé*, 127-136.
- Álvarez, M. (2007). *Universidad de Santiago de Compostela. Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*. Lugo, España.
- Antelo, A. (2008). *Universidad de Santiago de Compostela. Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares*. Lugo, España.
- Araujo, M., & Ruiz, A. (2014). *Universidad Politecnica Salesiana. Aislamiento de microorganismos con la capacidad de biotransformar los ácidos biliares hyodesoxicólico y desoxicólico*. Quito, Ecuador.
- Arcilla, L., & Fernández, J. (2008). *Universidad Tecnológica de Pereira. Estudio de la fracción insaponificable obtenida del aceite extraído de la semilla de la Luffacylindrica*. Pereira, Colombia.
- Arellanes, D. (1989). *Universidad Veracruzana. Litiasis Biliar y ventajas de la Colectectomia programada*. Universidad Veracruzana. Minatitlán, México.

- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 23-39.
- Audesirk, G., Audesirk, T., & Byers, B. (2008). *Biología La Vida en la Tierra*. México: Hispanoamericana.
- Bastidas, B., Gonzalez, M., & Panduro, A. (2005). Factores de riesgo en la génesis de la Litiasis Vesicular. La hepatología molecular: un enfoque multidisciplinar. *Revista Medigraphic Artemisa en línea*, 71-78.
- Beltrán, J. (2015). *Evaluación de la Capacidad de Biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico por Actinomicetos*. Quito.
- Boyer, J., & Nathanson, M. (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology*, 551-566.
- Briceño, K., & Castillo, X. (2009). *Diagnóstico Ambiental y Plan de Manejo para el camal municipal de Zapotillo*. Loja.
- Cannell, R. (1998). *Methods in Biotechnology*. New Jersey: Humana Press Inc.
- CAR/PL, C. d. (2003). *Aplicaciones de la Biotecnología en la Industria*. Cataluña, España.
- Correa, Y. (2009). *Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín . Biotransformación de los sustratos cinamaldehído y ácido (\pm)-2,4-isobutilfenilpropanóico mediante el hongo fitopatógeno Colletotrichum acutatum*. Medellín, Colombia.
- Costa, S. (2013). *Universidad de Ferrara. Biotrasformazioni di Acidi Biliari: Valorizzazione dei prodotti "Di Scarto" nella lavorazione di acido ursodesossicolico*. Ferrara, Italia.

- Dansey, M. (2012). *Universidad de Buenos Aires. Síntesis y actividad biológica de análogos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales*. Buenos Aires, Argentina.
- Duque, J. (2010). *Biología Panorámica de un Sector*. Coruña, Netbiblo, España.
- Elguero, J., & Alkorta, I. (2006). *Universidad Complutense. Resonancia magnética nuclear de protón: Aplicaciones en química orgánica*. Madrid, España.
- Fernández, E. (2013). *Universidad Complutense de Madrid.. Papel central de los citocromos p450 en el catabolismo del colesterol y su regulación en micobacterias*. Madrid, España.
- Fernández, R., Guzmán, M., & Herrera, J. (2004). *Malformaciones Congénitas Manejo y Diagnostico Neonatal*. Santiago de Chile, Chile: Editorial Universitaria.
- Hernández, D. (2008). *Universidad Tecnológica de Pereira. Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Pereira, Colombia.
- Herrera, C. (2011). *FILOGENIA BACTERIANA MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL RRNA 16S*. Tlalnepantla, México: Carrera de Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacalca. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Koolman, J., & Röhm, K. (2004). *Bioquímica: Texto y Atlas*. Madrid, España: Médica Panamericana.
- Larraona, P., & Manjavaca, A. (2008). Resonancia magnética nuclear (RMN). *I Encuentro Complutense para la Divulgación en Física Nuclear y de Partículas*, 10-19.
- Leiva, S. (2006). *Universidad Austral de Chile. Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la Microbiota Bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia*. Valdivia, Chile.

- Leza, J., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Moreno, A., Moro, M., & Portolés, A. (2008). *Velásquez Farmacología Básica y Clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- 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*. Quito.
- Maldonado, M. (2013). *Universidad de Ferrara. Biotrasformazioni di Acidi Biliari*. Ferrara, Italia.
- Mamianeti, A. (1999). *Micolitiasis vesicular y ácidoursodesoxicólico. Hospital Aeronáutico de Buenos Aires*. Buenos Aires, Argentina.
- Marín, I., Sanz, J., & Amils, R. (2005). *Biotecnología y Medioambiente*. Madrid, España: Ephemera.
- Martínez, Z., & Moreno, A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Revista BioTecnología*, 28-50.
- Mateos, P. (2000). Aislamiento y Selección de Microorganismos Industriales. *ResearchGate*, 13-15.
- Murcia, M. (2008). *Identificación de Enterobacterias*. Bogotá, Colombia.
- Naciones Unidas. (1992). *Convenio sobre la Diversidad Biológica*.
- Negrín, S., Sosa, A., Ayala, M., Diosdado, E., Perez, M., Pujol, M., . . . Costa, L. (2007). Enseñanza popular de la Biotecnología. *Biotecnología Aplicada 2007*, 53-57.
- Patnaik, P. (2010). *Handbook of Environmental Analysis*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.

- Pliego, F. (2011). Biotecnología y sus efectos en los procesos de producción. *Uciencia*, 42-43.
- ProEcuador. (2013). *Biotecnología*. Quito, Ecuador.
- Ramirez, L., Manjarrez, A., Perez, M., Solis, O., & Luna, H. (2009). Preparacion de ingredientes farmaceuticos activos derivados de aductos de BaylisHillman con Nocardiacorallina B-276. *Revista Mexicana de ciencias Farmaceuticas*, 5-11.
- Roda, A., Roda, E., & Hofman, A. (1999). *Acidi biliari aggiornamento per il futuro*. Barcelona: Masson.
- Roger, S., John, I., Mark, W., & Page, P. (1992). *Microbiología*. Barclona, España: Reverté.
- Romero, J., & Sotelo, N. (2006). Utilidad del Ácido Ursodesoxicólico en diferentes hepatopatíasUtilidad del Ácido Ursodesoxicólico en diferentes hepatopatías. Informe de 6 casos. *Medigraphic Artemisa en línea*, 69-80.
- Romero, L., Mejía, M., & A, Z. (2014). Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas . *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 1-9.
- Salazar, A., & Ordoñez, C. (2013). *Universidad de Pereira. Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Pereira, Colombia.
- Sánchez, I. (2014). *Universidad Politécnica Salesiana. Agrobiodiversidad y Soberanía Alimentaria en la Parroquia Peñaherrera, Cantón Cotacachi*. Quito, Ecuador.
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). *Tinción y observación de microorganismos*. Santa Fe, Argentina.
- Segarra, E. (2006). *Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas. Fisiología de los Aparatos y Sistemas*. Cuenca, Azuay, Ecuador: Imprenta de la Facultad de Ciencia Médicas.

- Serrano, J., & Sandoval, A. (2005). *Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos*. Mérida, Venezuela.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Santa Fé de Bogota, Colombia: Soporte Editorial.
- Soffer, F. (2000). Tratamiento no quirúrgico de la litiasis biliar. *Revista FacMed UNAM*, 140-141.
- Soler, T. (2012). *Universidad de Alicante. Preparación de estructuras derivadas de productos naturales (hidratos de carbono, esteroides y alcaloides) a través de intermedios organolíticos funcionalizados*. Alicante, España.
- Stambouljian, C. M. (2006). Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria. *bioanalysis*, 1-5.
- Timón, R. (2002). *Universidad de Extremadura. Variaciones del perfil esteroideo con diferentes tipos de ejercicio y actividad física*. Extremadura, España.
- Vaquero, J. (2013). *Universidad de Salamanca. 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*. Salamanca, España.
- Villegas, W., Acereto, P., & Vargas, M. (2006). *Análisis Ultravioleta Visible*. Yucatán, México: Dirección General de Desarrollo Académico.
- Vimal, V. (2009). Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian Journal of Medical Sciences*, 57-63.
- Yufera, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Barcelona, España: Editorial Reverté.

Anexos

Anexo 1. Ficha técnica Columbia Agar e Indicaciones para la preparación del producto deshidratado.

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 cantidad suficiente para (c.s.p.) 1 litro.

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

Indicaciones para 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).

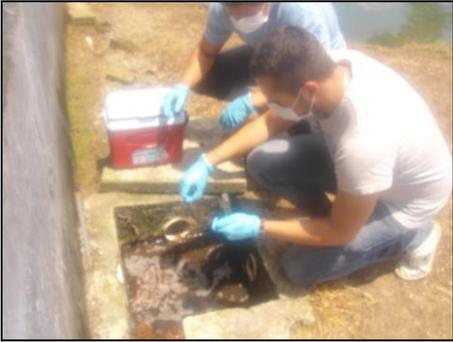
Anexo 2. Componentes del medio líquido ATT.

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

Nota: Componentes de medio ATT cantidad suficiente para 1 litro (c.s.p.).

Elaborado por S. Espinel, 2015.

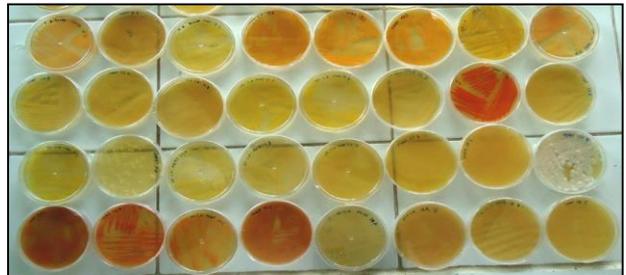
Anexo 3. Fotos del muestreo y cepas aisladas de actinomycetos.

Descripción	Imagen
Muestreo fosas - aguas residuales	 A photograph showing two individuals wearing white t-shirts and blue nitrile gloves. They are crouched in a concrete-lined pit containing murky, brownish water. One person is using a long-handled tool to stir the water, while the other is holding a white container, likely for collecting a sample.
Muestreo Camal de Sucúa	 A photograph showing two individuals in white t-shirts and blue nitrile gloves. They are crouched in a concrete-lined pit. One person is using a tool to sample the contents, which appear to be a mixture of water and organic matter. A red cooler is visible in the background.
Muestreo en vísceras de animales	 A very dark photograph showing what appears to be the internal organs (viscera) of animals, possibly in a laboratory or processing area. The lighting is low, highlighting the textures and colors of the organs.
Muestreo en pisos del camal	 A dark photograph showing a person wearing a green long-sleeved shirt and blue nitrile gloves. The person is crouching on a dark, possibly wet or soiled floor, and appears to be using a tool to sample the surface.

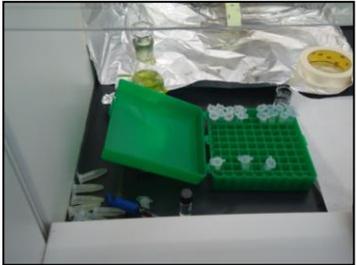
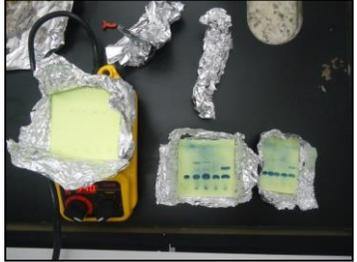
Cooler con las muestras tomadas



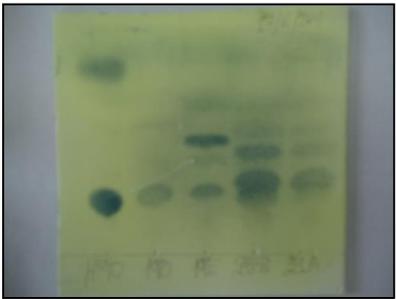
Cepas de actinomicetos aisladas y codificadas.



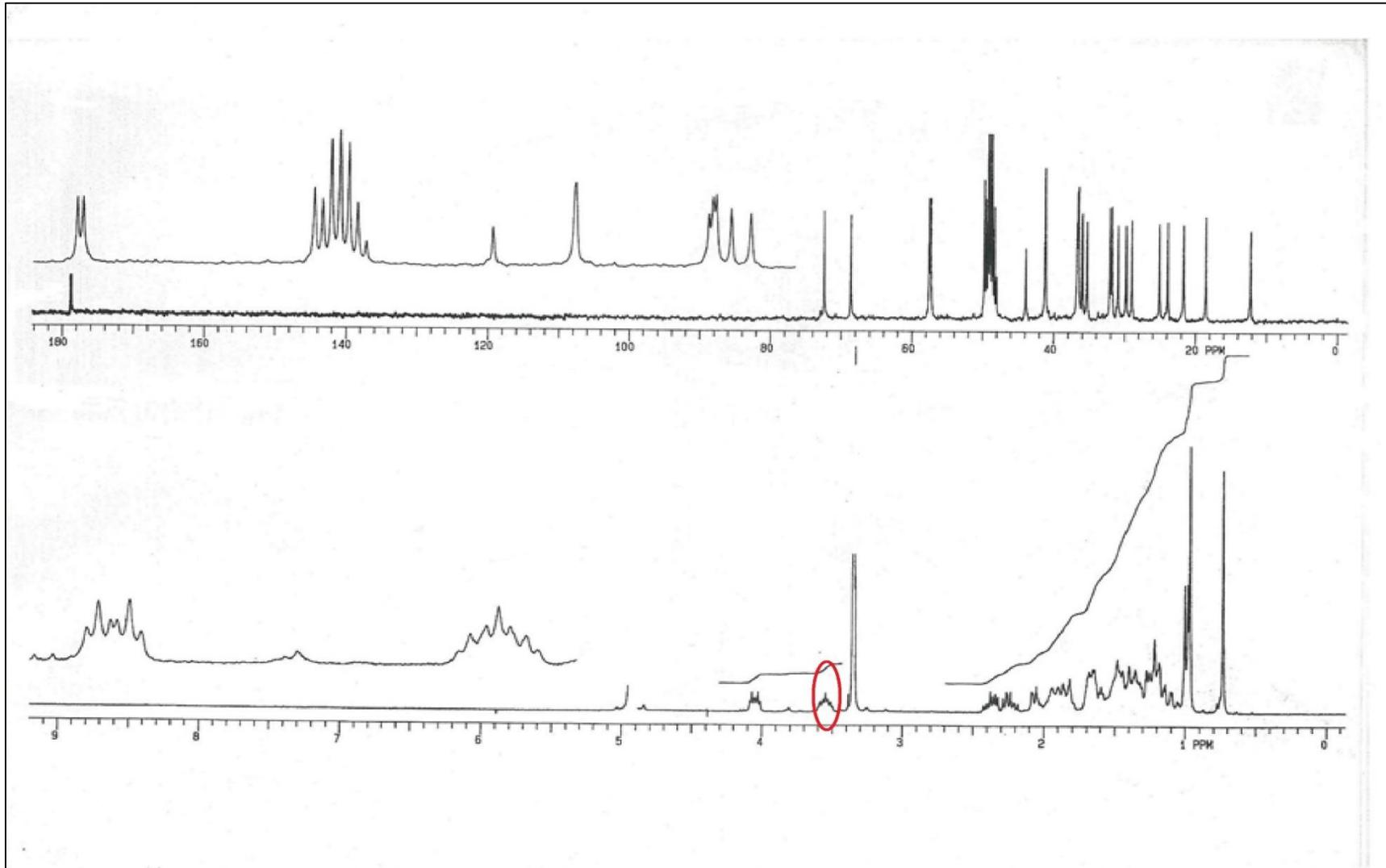
Anexo 4. Procedimiento Screening de la capacidad de biotransformación.

Descripción	Imagen
Cultivo líquido de microorganismos	
Muestras en Tubos Eppendorf	
Revelación de placas cromatográficas	
Raspado de placa preparativa	

Anexo 5. Placas cromatográficas de cepas de actinomicetos.

Cepas	Tiempo de control	Fotografía de la placa
MMAE-16D MMAE-17B MMAE-17C MMAE-17D	48 horas	
MMAE-19D MMAE-19A MMAE-20B MMAE-21A	48 horas	
MMAE-27A MMAE-28A MMAE-28B	48 horas	

Anexo 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido Hyodesoxicólico.



Anexo 7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Ácido 3-ceto-hyodesoxicólico

