

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

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

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

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOTRANSFORMAR LA SAL
SÓDICA DEL ÁCIDO CÓLICO POR ACTINOMICETOS**

AUTORA:

MICHELLE NATHALY CALVACHI ECHEVERRÍA

TUTORA:

MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

Quito, abril del 2016

Cesión de derechos de autor

Yo, Michelle Nathaly Calvachi Echeverría, con documento de identificación N° 1722503495, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LA SAL SÓDICA DEL ÁCIDO CÓLICO POR ACTINOMICETOS”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera 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 autora 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.

(Firma)



Nombre: Michelle Nathaly Calvachi Echeverría

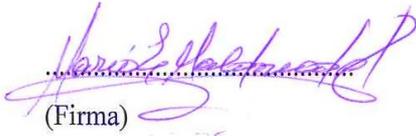
Cédula: 1722503495

Fecha: Quito, febrero del 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LA SAL SÓDICA DEL ÁCIDO CÓLICO POR ACTINOMICETOS, realizado por Michelle Nathaly Calvachi Echeverría, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero 2016



(Firma)

Nombres y apellidos completos del docente tutor/a: María Elena Maldonado Rodríguez

Cédula de identidad: 1707743157

Dedicatoria

Con mucho amor dedico este trabajo de grado a mi madre, mis hermanos, mi padre y mi novio, por apoyarme incondicionalmente en mi formación académica y guiarme en cada paso que he dado. A Dios porque siempre puso en mis pensamientos la siguiente frase “Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán. -Proverbios 16:3”

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana, por permitirme ser una buena profesional en Biotecnología de los Recursos Naturales. A mis formadores académicos, especialmente a mi tutora de trabajo de titulación, Dra. María Elena Maldonado, por permitirme ser parte de su proyecto de investigación, a la Dra. Valentina Venturi, por compartirme sus conocimientos durante el desarrollo de mi trabajo de titulación y su amistad incondicional. Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) y mis compañeros tesistas, a todos gracias.

Índice

Introducción.....	1
Capítulo 1	3
1.1. Esteroides	3
1.1.1 Concepto general	3
1.1.2. Clasificación	3
1.2. Colesterol.....	5
1.2.1. Estructura química	5
1.2.2. Biosíntesis del colesterol	5
1.3. Ácidos biliares	6
1.3.1. Síntesis de los ácidos biliares.....	8
<i>1.3.1.1. Secreción biliar</i>	<i>9</i>
1.4. Ácido Cólico.....	9
1.4.1. Colato de sodio	10
1.4.2. Importancia	11
<i>1.4.2.1. Participación en la biosíntesis del ácido ursodesoxicólico</i>	<i>11</i>
1.5. Ácido Ursodesoxicólico	12
1.5.1. Síntesis química	13
1.6. Actinomicetos.....	17
1.6.1. Usos	17
1.7. Biotransformación	18
1.7.1. Ventajas	18
1.7.2. Importancia	18
Capítulo 2	20
2.1. Localización.....	20
2.2. Lugares de muestreo	22

2.2.1.	Muestreo camal de Sucúa	22
2.2.2.	Muestreo de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco.....	23
2.2.3.	Muestreo de la ribera del río Machángara	24
2.2.4.	Metodología.....	25
Capítulo 3	33
3.1.	De las zonas de muestreo.....	33
3.2.	Del aislamiento y purificación de Actinomicetos.....	34
3.3.	De la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico por Actinomicetos aislados	36
3.4.	De la selección de las cepas con mayor capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico	40
3.5.	De la extracción de los productos de la biotransformación	44
3.6.	De la interpretación de los espectros RMN	45
3.7.	Tinción de Gram de la cepa MMAE-22C.....	45
Conclusiones.....	47
Recomendaciones	48
Referencias	49

Índice de tablas

Tabla 1. Ubicación de las zonas de muestreo	20
Tabla 2. Puntos específicos de muestreo del camal de Sucúa	23
Tabla 3. Puntos específicos de muestreo de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco	24
Tabla 4. Puntos específicos de muestreo de la ribera del río Machángara	25
Tabla 5. Formulación del medio líquido ATT; cantidad suficiente para 1 litro de preparación	28
Tabla 6. Cepas de actinomicetos obtenidos del camal de Sucúa.....	35
Tabla 7. Cepas de actinomicetos obtenidos de la Granja de la Misión Salesiana	35
Tabla 8. Cepas de actinomicetos obtenidos de la ribera del río Machángara.....	35
Tabla 9. Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico de cada cepa aislada del camal de Sucúa	38
Tabla 10. Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico, de cada cepa aislada de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco.....	39
Tabla 11. Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico, de cada cepa aislada de la ribera del río Machángara.	39
Tabla 12. Número de cepas que poseen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico.....	41
Tabla 13. Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico, en la fase de escalamiento del cultivo.	43

Índice de figuras

Figura 1. Esqueleto del ciclopentanohidrofenantreno	3
Figura 2. Núcleo esteroideo básico.....	4
Figura 3. Molécula del colesterol	5
Figura 4. Biosíntesis del colesterol.....	6
Figura 5. Estructura química de los principales ácidos biliares	7
Figura 6. Conversión del colesterol en ácidos biliares primarios.....	8
Figura 7. Síntesis de los ácidos biliares primarios y secundarios.....	9
Figura 8. Estructura química del ácido cólico.	10
Figura 9. Estructura molecular del colato de sodio	11
Figura 10. Oxidación del colato de sodio en las posiciones C-7 y C-12, por <i>Acinetobacter calcoaceticus lwoffii</i>	12
Figura 11. Estructura química del ácido ursodesoxicólico.....	13
Figura 12. Síntesis química del ácido quenodesoxicólico a partir del ácido cólico	15
Figura 13. Síntesis química del ácido ursodesoxicólico a partir del ácido quenodesoxicólico	16
Figura 14. Ubicación en el mapa del camal de Sucúa	21
Figura 15. Ubicación en el mapa Río Machángara	21
Figura 16. Ubicación en el mapa de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco.	22
Figura 17. Porcentaje de biotransformación, determinada por intensidad de la mancha.	37
Figura 18. Cepas que poseen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico, representada en porcentaje.....	42
Figura 19. Placas cromatográficas de las cepas MMAE-20B, MMAE-22C, MMAE-1A en la fase de escalamiento del cultivo.	43
Figura 20. Productos de la biotransformación de la sal sódica del ácido cólico por parte de la cepa MMAE-22C.....	45
Figura 21. Tinción de Gram de la cepa MMAE-22C	46

Índice de anexos

Anexo 1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del producto de interés (producto de oxidación en C ₃)	53
Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del ácido cólico.	54
Anexo 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del producto desconocido.....	55
Anexo 4. Fórmula del medio de cultivo DB DIFCO Columbia Agar Base; cantidad suficiente para 1 litro de preparación.	56
Anexo 5. Formulación del antibiótico ACTINOMYCETE SELECTATAB™	56

Resumen

Los actinomicetos son microorganismos, que se encuentran en el límite entre hongos y bacterias, siendo Gram positivos y Gram negativos. Se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, principalmente en suelo y agua.

La investigación busca encontrar actinomicetos capaces de biotransformar la sal sódica del ácido cólico, producto de desecho de la síntesis química del ácido ursodesoxicólico. Se aislaron 53 cepas de actinomicetos, a partir de muestras tomadas en los camales Macas-Sucúa y de la ribera del río Machángara en el parque “Las Cuadras”. Se evaluó la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico de las 53 cepas de actinomicetos aisladas, mediante técnicas como: la microbiología, cromatografía de capa fina (TLC) y Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), encontrándose que la reacción más frecuente es la oxidación del grupo hidroxilo de la posición 3.

Palabras clave: Sal sódica del ácido cólico, biotransformación, actinomicetos.

Abstract

Actinomycetes are microorganisms that they found in the limit between fungi and bacteria, they being generally Gram positive and Gram negative. They are usually distributed in nature, especially in soil, and water.

The research found actinomycetes able to biotransform the sodium salt of cholic acid, it is a waste product of chemical synthesis of ursodeoxycholic acid. 53 strains of actinomycetes were isolated from samples taken in slaughterhouses of Macas-Sucúa and Machángara bank of river in the park "Las Cuadras". It was evaluated of Biotransformation capacity of the sodium salt of cholic acid of the 53 isolated strains of actinomycetes, it using techniques such as microbiology, Thin Layer Chromatography (TLC) and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). Finding the most common reaction of biotransformed the actinomycetes, it is oxidation of the hydroxyl group at position 3.

Key words: sodium salt of cholic acid, biotransformation, actinomycetes.

Introducción

Hace más de 70 años se inició la búsqueda de microorganismos capaces de degradar el colesterol. Fernández (2013, pág. 24), encontró que, especies de *Mycobacterium* utilizan el colesterol como única fuente de carbono y energía, descubriendo que, los microorganismos si poseen capacidad de degradar estructuras esteroideas. Esther (2013, pág. 11), halló que, el microorganismo *Rhodococcus erythropolis*, acumula compuestos estructuralmente relacionados con el colesterol, degrada dicha molécula y además tiene la capacidad de sintetizar nuevos derivados de esteroides.

La aplicación de la Biotecnología en diversos campos, es una realidad, debido a que es una tecnología eficaz, porque es posible sintetizar compuestos de interés mediante reacciones biológicas en las que intervienen enzimas y microorganismos, en lugar de reacciones químicas, limpia por ser una tecnología en la que utiliza fuentes de energía y materias primas de origen biológico, elimina el uso frecuente de fuentes fósiles como el petróleo o carbón, genera menos residuos tóxicos, consume menos energía y agua, y es competitiva en cuanto se refiere a calidad y precio, además que, resuelve problemas importantes en el sector industrial, agropecuario, salud y de medio ambiente.

Se conoce que los ácidos biliares son esteroides formados durante el catabolismo del colesterol y que entre este grupo se encuentra el ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, el ácido litocólico y en menor proporción el ácido ursodesoxicólico. El ácido biliar más importante es este último, debido a que es utilizado como agente clínico para el tratamiento de enfermedades intestinales, teniendo eficacia en la disolución de piedras biliares (Antelo Queijo, 2010, pág. 202).

El problema que se presenta en la producción de los ácidos biliares, se da principalmente en la síntesis de las complejas moléculas esteroideas debido a que requieren reacciones muy específicas. Es el caso del ácido ursodesoxicólico, que para la síntesis química necesita de un proceso largo y peligroso, que consta de 14 pasos, en el que se utiliza grandes cantidades de tóxicos como el cromo, hidróxido de sodio, disolventes orgánicos, entre otros (Daza Vélez & Pineda Chavez, 2014, pág. 6), este proceso genera productos de desecho como lo son: el ácido cólico, desoxicólico y hyodesoxicólico, provocando un alto grado de contaminación ambiental.

La aplicación de técnicas biotecnológicas es una solución a este problema, ya que es posible usar procesos de biotransformación, que, por medio del uso de microorganismos (ejemplo: Actinomicetos), sean capaces de biotransformar el ácido cólico en moléculas nuevas de interés industrial, que serán generadas durante la síntesis del ácido ursodesoxicólico, reduciendo así, la contaminación ambiental generada por dicho proceso, para ser aplicados en el campo farmacéutico, cosmético y alimentario, lo que representa un punto a favor para su estudio y aplicación (Maldonado, 2013, pág. 92).

Esta investigación tiene como objetivo, “evaluar la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico por microorganismos, Actinomicetos aislados de las provincias de Pichincha y Morona Santiago” (Universidad Politécnica Salesiana, 2014). Para lo cual, se aislarán microorganismos pertenecientes al grupo de Actinomicetos en los camales de Macas y Sucúa (Morona Santiago) y en la ribera del río Machángara en el parque “Las Cuadras” (Pichincha), se evaluará la capacidad de los microorganismos de biotransformar la sal sódica del ácido cólico, mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos, para que finalmente, se identificarán a los microorganismos biotransformadores de la sal sódica del ácido cólico, mediante la tinción de Gram. Se espera obtener Actinomicetos aislados que posean o no, la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Esteroides

1.1.1 Concepto general

Los esteroides son lípidos insaponificables, que no se hidrolizan en presencia de hidróxidos. Derivan de un núcleo fundamental, formado por tres anillos de un fenantreno hidrogenado y un ciclopentano; son, por tanto, derivados de un cicloalcano tetracíclico: el ciclopentanohidrofenantreno (Primo Yúfera, 2005, pág. 947).

Esqueleto del ciclopentanohidrofenantreno

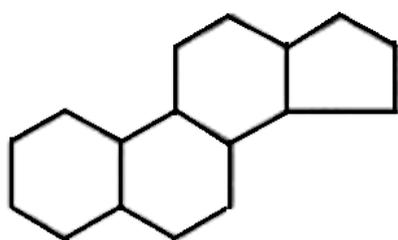


Figura 1.

Tomado de (Primo Yúfera, 2005, pág. 947)

1.1.2. Clasificación

Dentro de este grupo se encuentran: el colesterol y otros esteroides, los ácidos biliares, las hormonas sexuales, las hormonas de la corteza suprarrenal o corticoides (cortisona y otras), cardiotónicos (digitalinas), entre otros.

Los esteroides se clasifican en función del número de carbonos que se encuentran unidos al C-17(*)¹ del esqueleto del ciclopentanohidrofenantreno.

¹ *: Carbono 17. Hace referencia a la posición del carbono en el esqueleto del ciclopentanohidrofenantreno.

Núcleo esteroideo básico

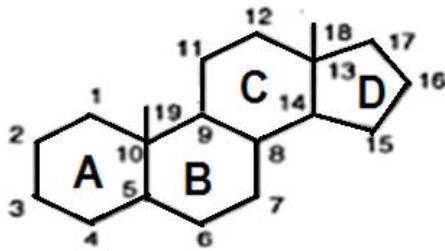


Figura 2.

Tomado de (Primo Yúfera, 2005, pág. 948)

Koolman & Heinrich Röhm (2004, págs. 56-57), mencionan que los esteroides más importantes son tres grandes grupos:

- Esteroides con 8, 9 o 10 carbonos en el C-17. Esteroles.

Los esteroles son alcoholes esteroideos, presentes en todos los seres vivos. En la cadena lateral tienen de 8 a 10 carbonos en el C-17 y un grupo OH en el C-3. El esteroide más importante en los animales es el colesterol, en las plantas y en microorganismos poseen esteroides similares al colesterol, y son: el ergosterol, β -sitosterol, y estigmasterol.

- Esteroides con 5 carbonos en el C-17. Ácidos Biliares.

Los ácidos biliares se forman en el hígado a partir del colesterol, del donde deriva su estructura. Son esteroides cuya cadena lateral tiene 5 carbonos en el C-17, unidos con un grupo carboxilo.

- Esteroides con 2 carbonos en el C-17. Hormonas esteroideas

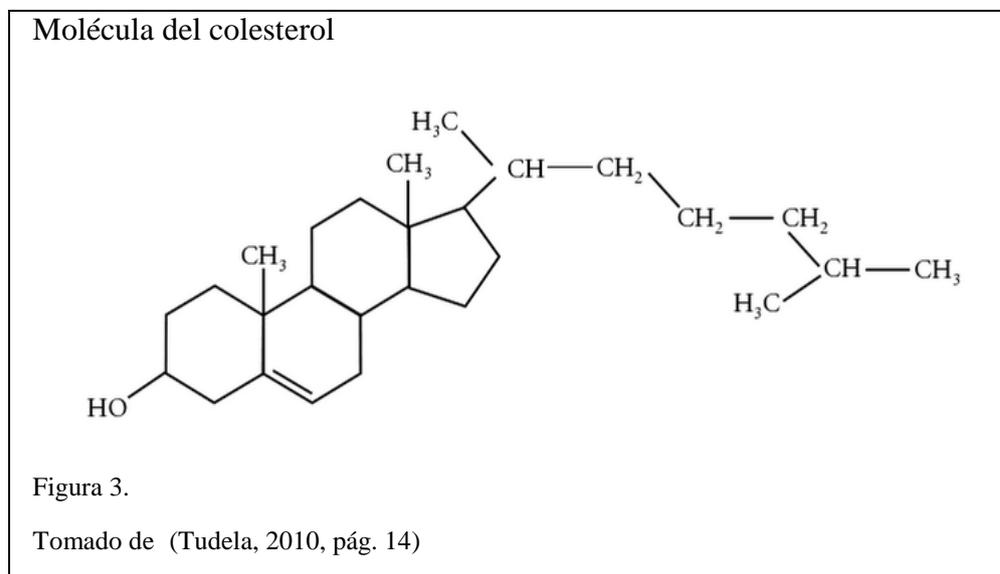
Las hormonas sexuales más importantes son: testosterona (masculino), progesterona (femenino), se producen en las gónadas, ovario y testículo (Teijón Rivero & Garrido Pertierra, 2006, pág. 387). Posee un grupo cetónico en la cadena lateral de 2 carbonos unidos al C-17 y otro grupo cetónico en C-3, conjugado con el enlace doble Δ -4 (doble enlace en el carbono 4 y 5).

1.2. Colesterol

El colesterol es el esteroide más abundante en los seres humanos, fue aislado de los cálculos biliares por primera vez en el siglo XVIII por Conradi (1775). Se encuentra en la sangre, la bilis, el cerebro, tejido nervioso, y en las membranas celulares (Drew H., 1995, pág. 456). Es un esteroide, soluble en alcohol, éter, acetona o cloroformo e insoluble en agua. El colesterol es precursor de las hormonas esteroideas y las sales biliares. (Brown & Peterson, 2008, pág. 56)

1.2.1. Estructura química

Posee un enlace doble en la posición C-5-6, un grupo alcoholístico en el C-3 y una cadena ramificada de 8 carbonos en el C-17. Su estructura es la siguiente:



1.2.2. Biosíntesis del colesterol

La síntesis del colesterol inicia con la acetil-CoA, (Koolman & Heinrich Röhm, 2004, pág. 172), mencionan que la ruta biosintética del colesterol se da lugar en el retículo endoplasmático liso y consta de cuatro partes: formación del mevalonato, del isopentenil-difosfato, del Escualeno y del colesterol.

Biosíntesis del colesterol

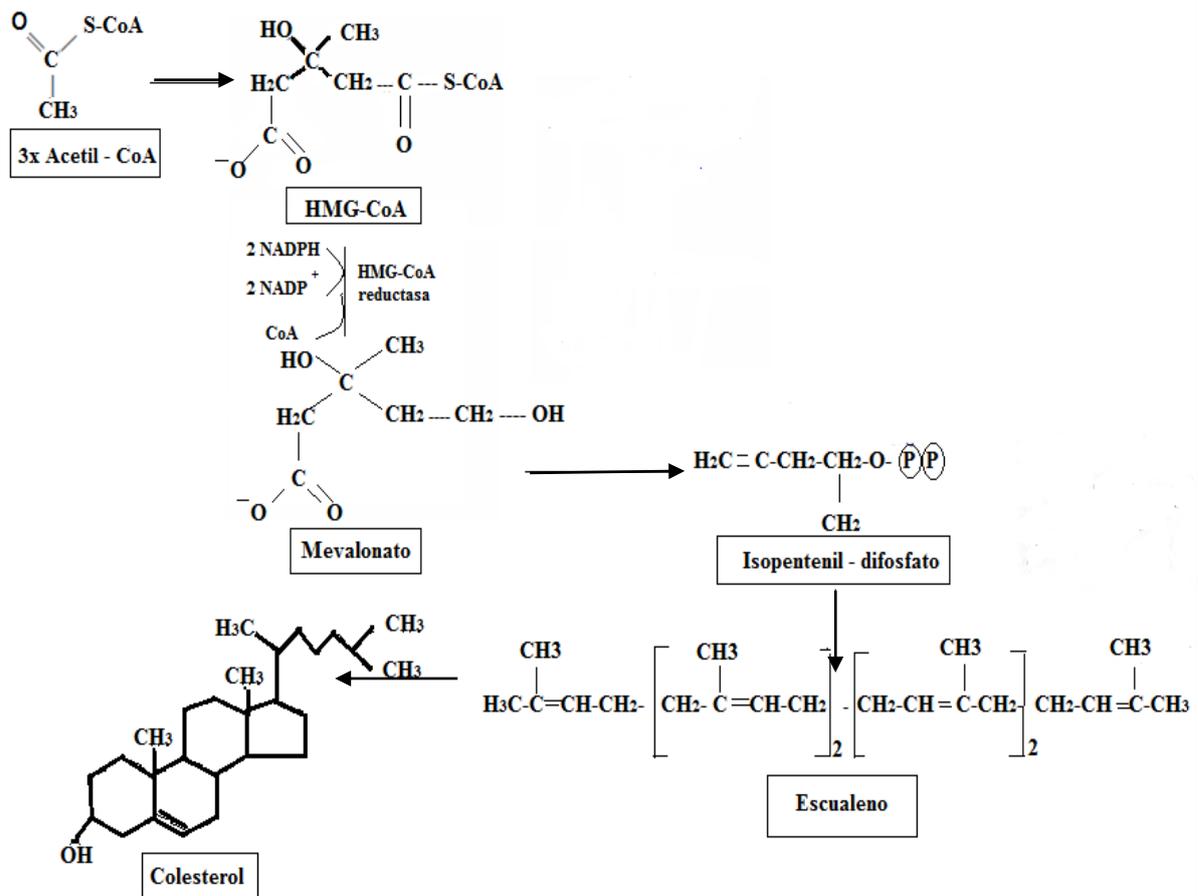


Figura 4.

Elaborado por Calvachi M., 2015

1.3. Ácidos biliares

Los ácidos biliares son esteroides formados durante el catabolismo del colesterol. Hans y Wolfgang (1987), mencionan que entre los ácidos biliares principales se encuentran: ácido cólico (ácido 3 α , 7 α , 12 α - trihidroxi-5 β -colánico), ácido desoxicólico (ácido 3 α , 7 α - dihidroxi-5 β -colánico), ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α , 12 α - dihidroxi-5 β -colánico), y ácido litocólico (ácido 3 α -hidroxi-5 β -colánico) (pág. 742).

Estructura química de los principales ácidos biliares

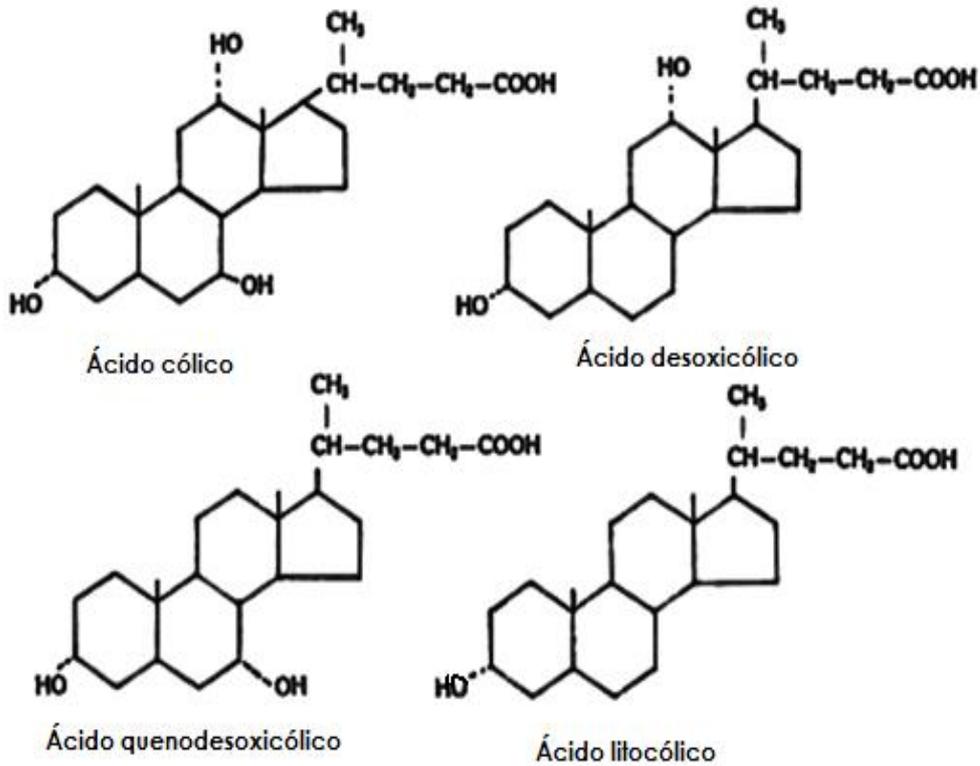
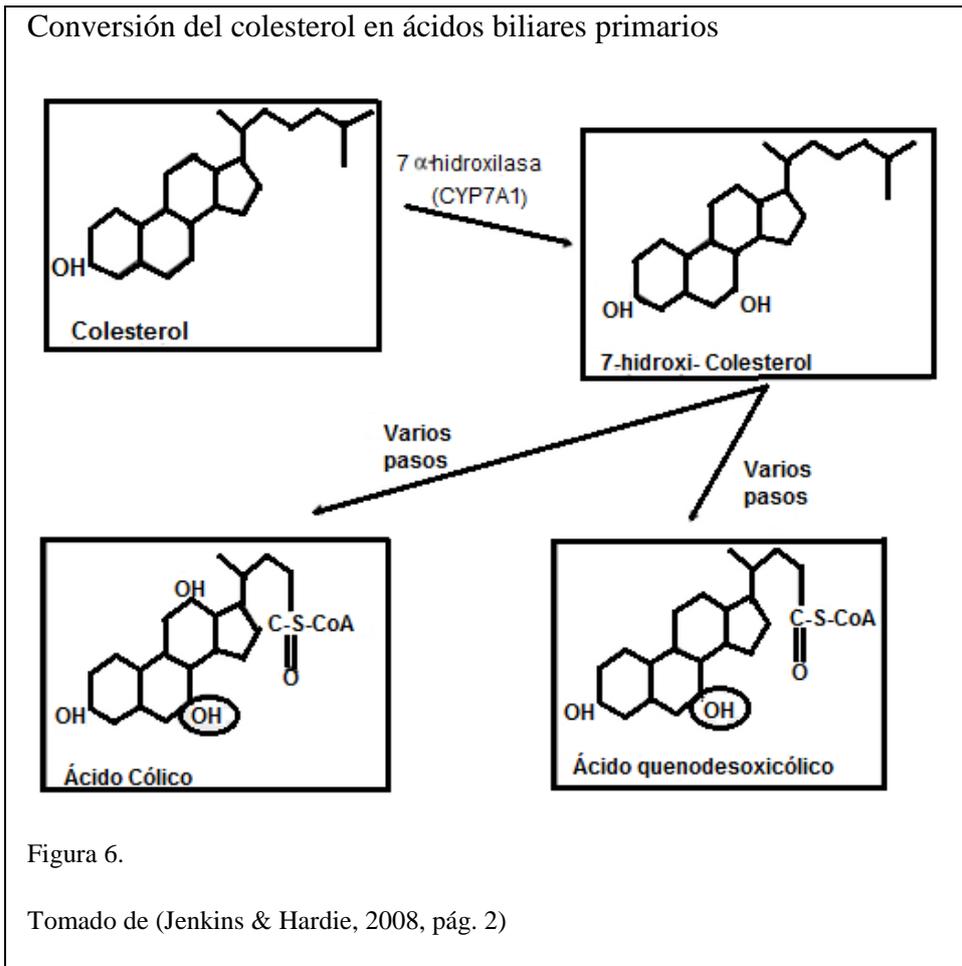


Figura 5.

Tomado de (Pena, 2004, pág. 120)

Existen dos grupos de ácidos biliares y son: los ácidos biliares primarios, formando parte de este grupo el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico y a partir de estos ácidos, mediante reducción bacteriana en la posición 7 de la estructura anular, dan origen a los ácidos biliares secundarios: el ácido desoxicólico a partir del ácido cólico y el ácido litocólico a partir del ácido quenodesoxicólico, respectivamente. Posteriormente se produce la epimerización del oxidrilo de la posición C-7 del ácido quenodesoxicólico, dando lugar al ácido ursodesoxicólico (pág. 1). En la siguiente figura, se aprecia la conversión del colesterol en ácidos biliares primarios por la enzima 7 α -hidroxilasa (también conocido como CYP7A1) (Sernka & Jacobson, 1982, pág. 80).



1.3.1. Síntesis de los ácidos biliares

Es el mecanismo principal para la excreción corporal del colesterol en exceso. Los ácidos biliares son los constituyentes principales de la bilis y actúan como fuerza impulsora de la secreción biliar. La síntesis de ácidos biliares disminuye cuando, hay presencia de altos niveles séricos de estos compuestos y aumenta por la ausencia de los mismos, esto ocurre cuando existe exceso de pérdida fecal (Sernka & Jacobson, 1982, pág. 76).

En el hígado se sintetiza estos esteroides, a partir del colesterol; en una primera etapa el colesterol es convertido en 7-hidroxicolesterol por acción de la 7α-hidroxilasa, dando lugar al 7-hidroxi-Colesterol; a partir de este compuesto se obtiene los ácidos biliares primarios, cólico y quenodesoxicólico, y por sucesivas hidroxilaciones se forma colil-CoA, que será el intermedio de los demás ácidos biliares. Ahora los ácidos biliares primarios son conjugados con glicina y taurina, dando lugar a los ácidos glicocólico, taurocólico, glico quenodesoxicólico y tauro quenodesoxicólico. El 4% de estos compuestos llegan al colon, donde son desconjugados y convertidos en ácidos biliares secundarios, desoxicólico, litocolico y ursodesoxicólico, por la acción de bacterias presentes en el colon (Kelley, 1992, pág. 466).

Síntesis de los ácidos biliares primarios y secundarios

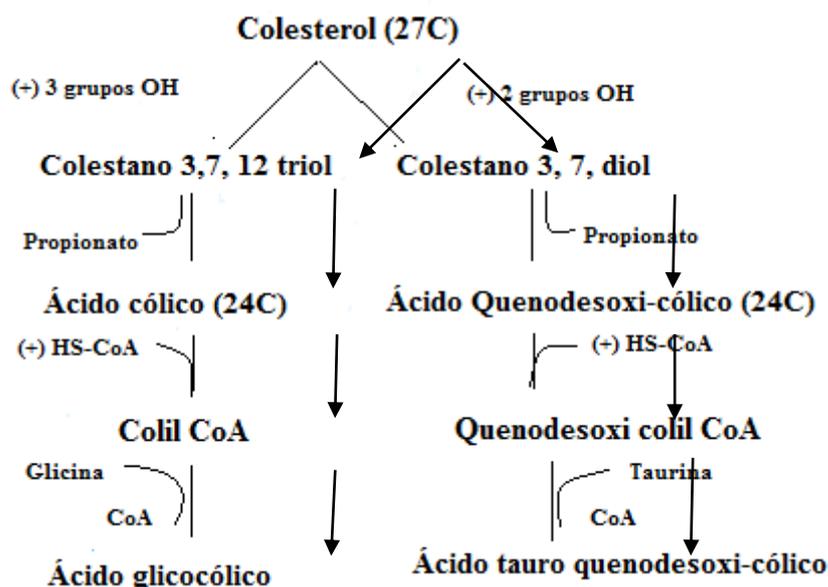


Figura 7.

Tomado de (Vasudevan, Sreekumari, & Vaidyanathan, 1995, pág. 156)

1.3.1.1. Secreción biliar

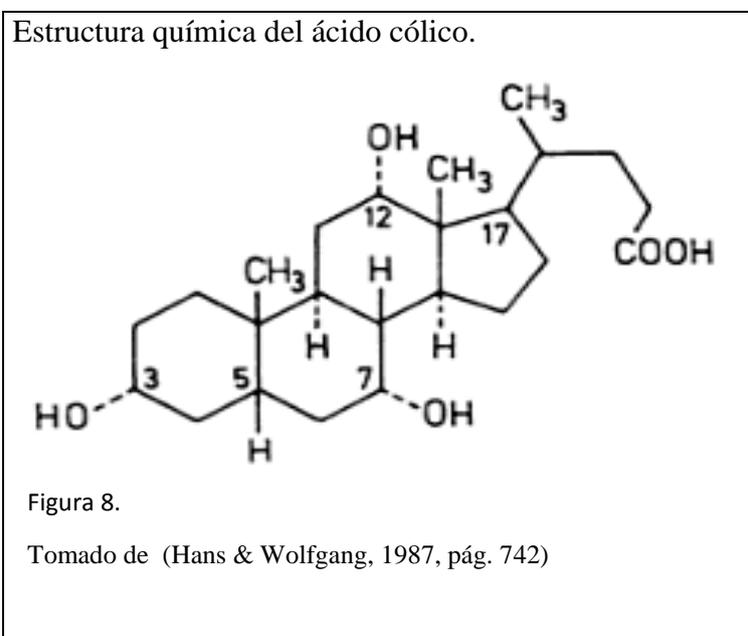
La bilis es secretada por el hígado y se almacena en la vesícula biliar; con la ingesta de alimentos, es expulsada al duodeno, donde se mezcla con las grasas. Las sales biliares emulsionan las grasas, proceso en el cual estos compuestos se unen a los fosfolípidos, para romper los glóbulos de grasas, asociando su lado hidrofóbico con el lípido y su lado hidrofílico con el agua, debido a que las sales biliares son moléculas anfipáticas. Las sales biliares son absorbidas activamente en el íleon y vuelven al hígado, para ser de nuevo excretadas. La disminución de los ácidos biliares y fosfolípidos o el aumento en el contenido de colesterol, dará a la formación de cálculos biliares en la vesícula. (Sernka & Jacobson, 1982, págs. 95-97)

1.4. Ácido Cólico

“El ácido cólico es un ácido biliar denominado: ácido 3 α , 7 α , 12 α - trihidroxi-5 β -colánico, es una sustancia blanca cristalina insoluble en agua, con un punto de fusión de 200 - 201 °C” (Chiang, 2009, pág. 1955).

Las sales del ácido cólico se denominan colatos. El ácido cólico es uno de los cuatro ácidos que produce el hígado sintetizado a partir de colesterol. Posee solubilidad en alcohol y en ácido acético, forma un conjugado (los átomos se unen mediante enlace covalente, para que los electrones puedan distribuirse entre varios centros) con el aminoácido taurina, dando lugar a ácido taurocólico (Chiang, 2009, págs. 1955-1956). Este ácido es muy importante, debido a que interviene en la síntesis de otros ácidos biliares citados anteriormente (Chiang, 2009, págs. 1955-1956). El ácido cólico es uno de los cuatro ácidos que produce el hígado, sintetizado a partir de colesterol.

En la década de los cuarenta, el ácido cólico fue aislado de la bilis del buey, convirtiéndose en producto de interés comercial, por poseer los efectos anti-inflamatorios de la cortisona.



1.4.1. Colato de sodio

En la naturaleza el ácido cólico se presenta como sal, colato de sodio. Su fórmula química es $C_{24}H_{39}O_5Na$, con peso molecular de 430.53 g/mol.

Estructura molecular del colato de sodio

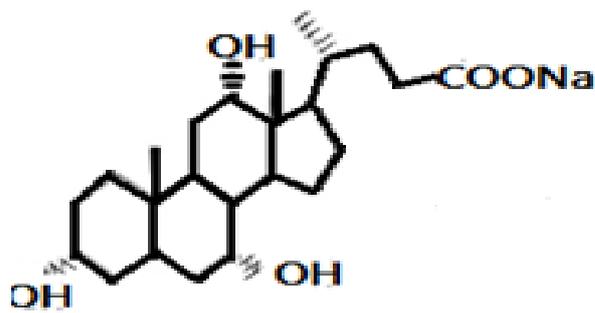


Figura 9.

Tomado de (Giovannini, Grandini, Perrone, Pedrini, Fantin, & Fogagnolo, 2008, pág. 1338)

1.4.2. Importancia

La importancia de este ácido se detalla a continuación:

1.4.2.1. Participación en la biosíntesis del ácido ursodesoxicólico

Sutherland, Macdonalda, & Forresta (2006, págs. 307-321), en su estudio de la biosíntesis del ácido ursodesoxicólico a partir del ácido cólico, analizaron tres posibles rutas para la síntesis del ácido ursodesoxicólico que fueron: la oxidación por la enzima 12 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) del género *Clostridium* P a ácido 3 α , 7 α -dihidroxi-12-ceto-5 β -colánico (12K-CDC); isomerización por la enzima 7 α - y 7 β -HSDH de 12K-CDC de la especie *Clostridium. absonum* para obtener el ácido 3 α , 7 β -dihidroxi-12-ceto-5 β -colánico, y la reducción de 12K-UDC a ácido ursodesoxicólico (UDC) por el método de Wolff-Kishner; la isomerización por la enzima 7 α - y 7 β -HSDH de la especie *Clostridium absonum*, de ácido cólico a ácido ursocólico (UC), oxidación por la enzima 12 α -HSDH del género *Clostridium*, de UC a 12K-UDC y la reducción de 12K-UDC a ácido ursodesoxicólico (UDC) por el método Wolff-Kishner; oxidación por la enzima 12 α -HSDH del género *Clostridium* P, de ácido cólico a 12K-CDC, reducción de 12K-CDC a ácido quenodesoxicólico (CDC) por el método Wolff-Kishner y la isomerización del CDC para obtener UDC usando cultivos de células enteras de *Clostridium absonum*. Encontrando que el tercer método es el más exitoso debido a que presenta un rendimiento global de 37% (UDC) verificándose su estructura mediante espectroscopía de masas.

Así mismo, Giovannini y otros (2008, págs. 1387-1389), han realizado diversas investigaciones de la síntesis y biotransformación de los ácidos biliares. En su más reciente trabajo, han identificado bacterias capaces de oxidar regioselectivamente el grupo OH del ácido cólico, encontrando que, el *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii*, aislado del suelo de la industria ICE, mostró una buena actividad en la oxidación de las posiciones C-7 y C-12, permitiendo de esta forma indicar la importancia del ácido cólico, ya que este compuesto, sirve como punto de partida para la síntesis del ácido ursodesoxicólico, debido a que, por medio de este microorganismo se obtiene las enzimas 7 α y 12 α -hidroxiesteroide deshidrogenasas (HSDH), importantes para su síntesis.

Oxidación del colato de sodio en las posiciones C-7 y C-12, por Acinetobacter calcoaceticus lwoffii

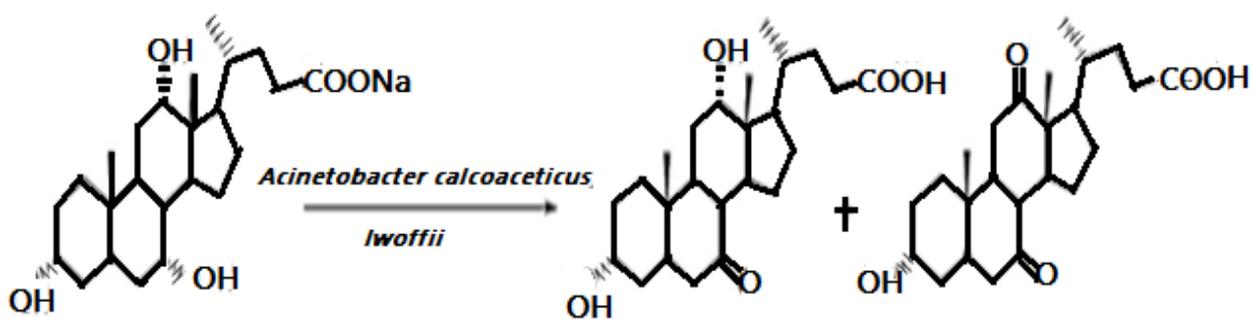


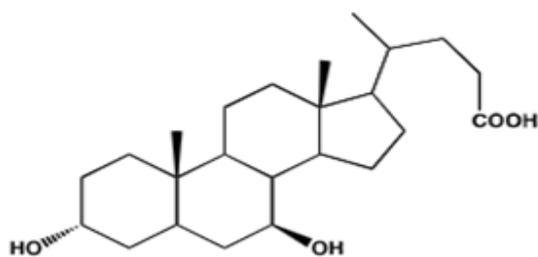
Figura 10.

Tomado de (Giovannini, Grandini, Perrone, Pedrini, Fantin, & Fogagnolo, 2008, pág. 1388)

1.5. Ácido Ursodesoxicólico

El ácido ursodesoxicólico se encuentra en menor cantidad en la naturaleza, representando, dentro de los ácidos biliares menos del 5%. Es conocido también como Ursodiol; es poco soluble en agua, acetona y cloruro de metileno y posee solubilidad en alcohol. “Tiene 24 átomos de carbono y una hidroxilación en las posiciones C3, C7 y 24 α ; es el 7 β -epímero del ácido quenodesoxicólico” (Maldonado, 2013, pág. 11).

Estructura química del ácido ursodesoxicólico



Ácido Ursodesoxicólico

Figura 11.

Tomado de (Maldonado, 2013, pág. 12)

Hay varios estudios de este ácido biliar, acerca de sus usos y biosíntesis. Se ha utilizado tradicionalmente, como un remedio popular para las enfermedades digestivas y también en el tratamiento de los trastornos biliares tales como cálculos biliares y colestasis; En estudios *in vitro* y en animales se ha encontrado que el ácido ursodesoxicólico (AUDC), puede tener acciones preventivas en el cáncer de colón (incluye neoplasias del colón, recto y apéndice); en general, dependiendo de la concentración de AUDC, disminuye la viabilidad y proliferación de células tumorales en humanos y animales cultivadas en un tiempo-y. (Alexandrova , Kalfin RE, Leventieva , Jivkova , & Dyakova , 2010, pág. 1842). (Kimura, Okamura, & Kawaide, 1993, págs. 1003-1006), menciona que, la biosíntesis del ácido ursodesoxicólico, se ha realizado a través de diversas biotransformaciones microbianas de los ácidos biliares y son: de ácido cólico (CA) a ácido quenodesoxicólico (CDCA) por *Clostridium perfringens* (deshidroxilación en la posición 12); de CA a ácido 3 α , 7 β , 12 α -trihidroxi- 5 β - colánico por *Clostridium absonum* o *Clostridium limosum* (isomerización del grupo hidroxilo en la posición 7); de ácido litocólico a AUDC por *Fusarium* o *Pleurotus* (7 β -hidroxilación); de ácido dehidrocólico (DHCA) a ácido 3 α , 7 α -dihidroxi- 12 ceto- 5 β - colánico (12KCDCA) por *Lactobacillus xylosus* o *Brevibacterium juscus* (reducción del grupo 3,7-ceto); y de CDCA a 7KLCA por *Pseudomonas sp.* (Oxidación del grupo 7 α -hidroxilo).

1.5.1. Síntesis química

Desde hace 3000 años en la medicina tradicional China, éste ha sido utilizado para el tratamiento de cálculos vesiculares y demás problemas hepáticos. Este ácido biliar, era extraído de la bilis de osos, específicamente de la familia Ursidae, por presentarse en

mayor cantidad que en otros mamíferos, por lo que su explotación era cada vez más grande. En el siglo 20, el ácido ursodesoxicólico fue descubierto por la medicina occidental como un compuesto capaz de disolver los cálculos biliares. En la actualidad éste es utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades hepáticas colestásicas, por ejemplo la cirrosis biliar primaria (Wiemuth, Sahin, Lefèvre, Wasmuth, & Gründer, 2012, pág. 39). Para impedir que más animales sean sacrificados, se realizaron diversos estudios para que por medio de otros procesos, se obtenga este ácido biliar, y estos son, utilizar el ácido cólico, siendo el sustrato principal de partida para la síntesis del ácido ursodesoxicólico, mediante métodos de biotransformación por microorganismos.

Maldonado (2013, pág. 22) menciona que, Fieser y Hofmann en los años 50 desarrollaron una metodología para la síntesis química del ácido quenodesoxicólico y ácido ursodesoxicólico y consta de los siguientes pasos:

- La esterificación con metanol, dando lugar al metilcolato;
- La acetilación regioselectiva con piridina y anhídrido acético de los grupos hidroxilo en posición C-3 y C-7, con el fin de proteger a los grupos funcionales.
- La oxidación en C-12 con CrO_3 .
- La hidrólisis del grupo metilo y acetilo.
- La Reducción de Wolff-Kishner, obteniendo finalmente el ácido quenodesoxicólico.

Síntesis química del ácido quenodesoxicólico a partir del ácido cólico

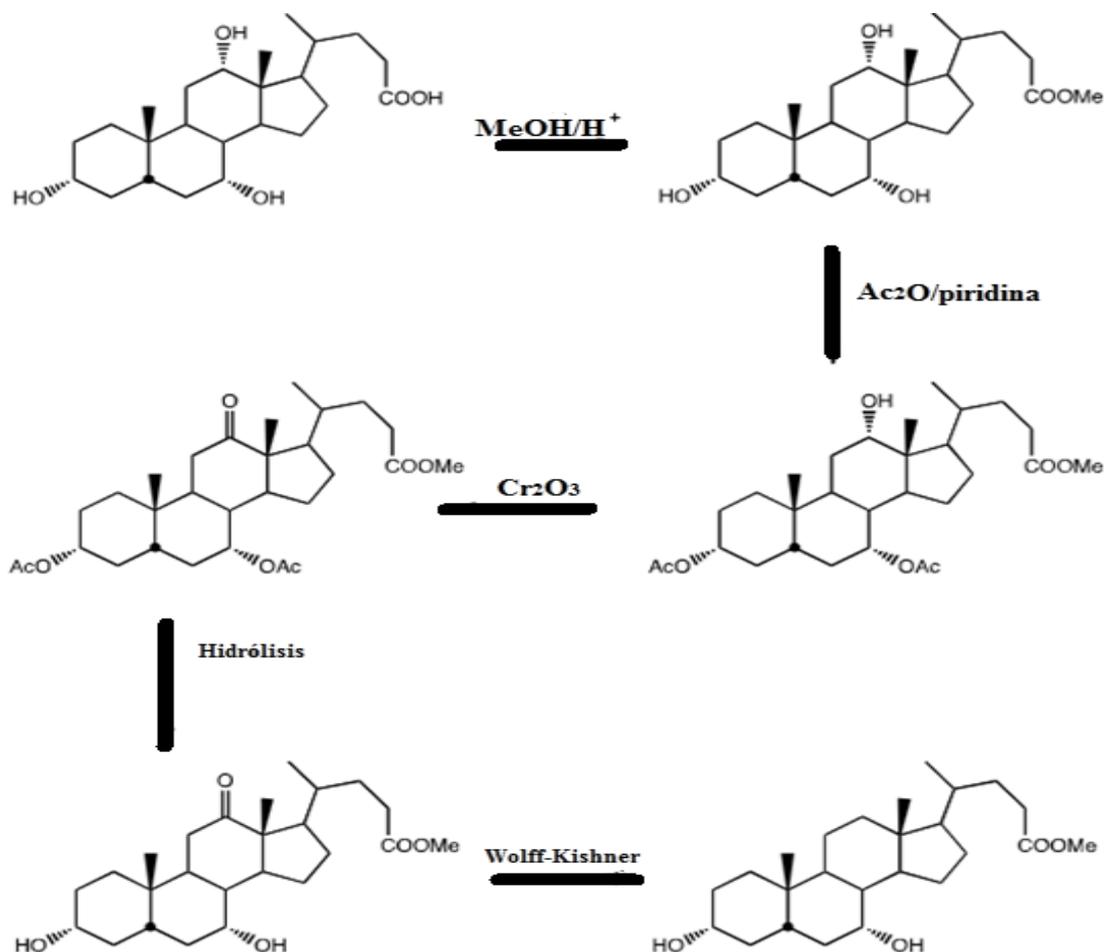


Figura 12.

Tomado de (Maldonado, 2013, pág. 23)

Después de obtener el ácido quenodesoxicólico a partir del ácido cólico, es posible obtener el ácido ursodesoxicólico, por inversión selectiva de α/β del oxidrilo en la posición C-7.

- Esterificación con metanol, dando lugar al metilcolato;
- Acetilación regioselectiva con piridina y anhídrido acético del oxidrilo en la posición C-3
- Oxidación en la posición C-7 con CrO₃.
- Reducción estereoselectiva del grupo ceto en la posición C-7 con sodio.

Síntesis química del ácido ursodesoxicólico a partir del ácido quenodesoxicólico

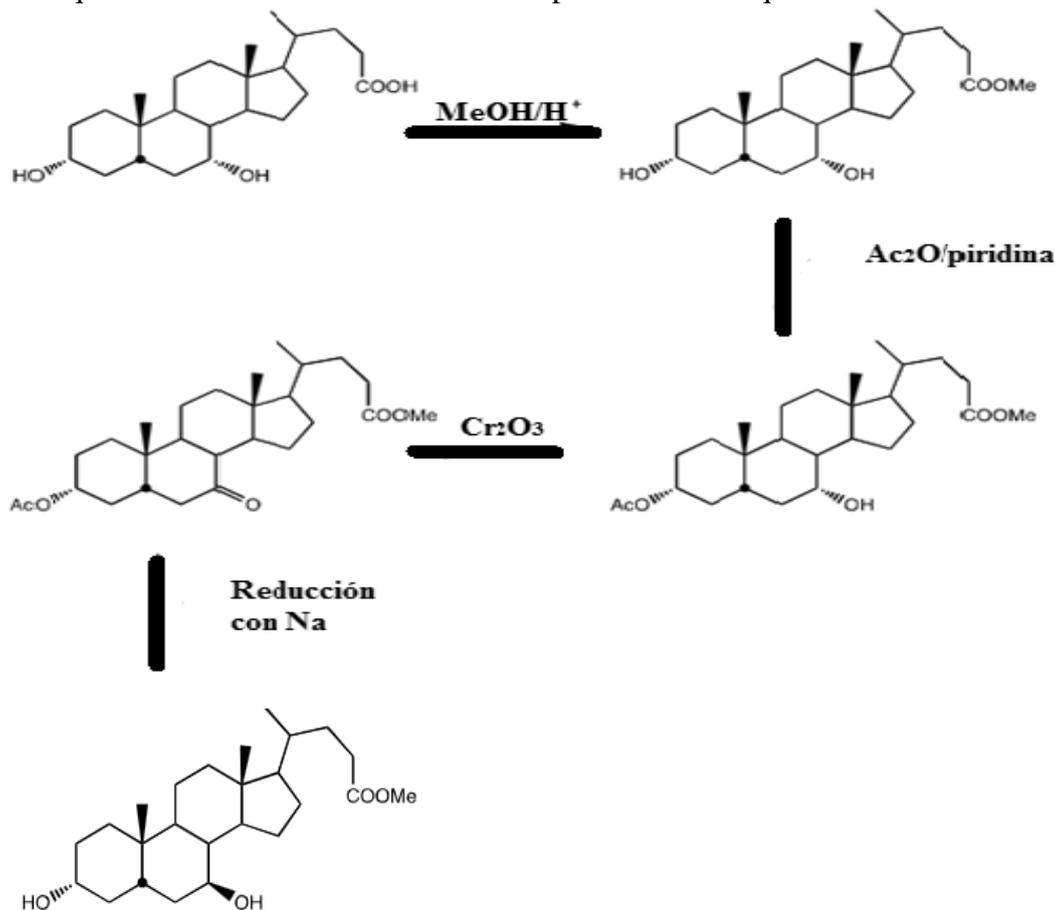


Figura 13.

Tomado de (Maldonado, 2013, pág. 24)

La síntesis química del ácido ursodesoxicólico acarrea muchos problemas, en cuanto se refiere a contaminación ambiental y a los altos costos que esta representa, ya que es un proceso largo, complicado y riesgoso debido a la naturaleza y la toxicidad de los reactivos utilizados. Durante este proceso se utiliza grandes cantidades de NaOH, sales de cromo y disolventes orgánicos o procesos de purificación, que son necesarios para eliminar los subproductos que se forman en cada etapa de reacción. (Daza Vélez & Pineda Chavez, 2014, pág. 15)

Para evitar que la contaminación ambiental aumente por este tipo de procesos, se ve la necesidad de realizar investigaciones como ésta, que por medio de la biotransformación con microorganismos sean capaces de reducir los pasos para la producción de los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico; además que éste método biotecnológico tiene la

ventaja de ser ecológico ayudando así al medio ambiente y de ser menos peligroso para los operadores. (Araujo Guayasamín & Ruíz Moreno, 2014, pág. 20)

1.6. Actinomicetos

“Los Actinomicetos son bacterias Gram positivas o Gram negativas que generalmente en algún momento de su ciclo de crecimiento desarrollan células filamentosas, ramificadas que fragmentan en cocos y bacilos” (Serrano, 2005, pág. 16). Además son bacterias aeróbicas, parcialmente ácido resistentes (resistencia a la decoloración de la fucsina básica (rojo)); son heterótrofas; utilizan fuentes de carbono simple y complejo así como “compuestos moleculares orgánicos: ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos”, para su desarrollo. (Salazar Loaiza & Ordóñez Guerrero, 2013, pág. 33)

En un principio los actinomicetos se clasificaban como hongos, porque su morfología y desarrollo tenían gran similitud. Poseen un micelio verdadero; denominándose así como “hongos radiados”. Sin embargo, debido a su carácter procariótico, se clasificaron más tarde como bacterias (Franco Correa, 2010, pág. 240). En la actualidad, se considera que los actinomicetos son organismos que se encuentran, entre bacterias y hongos (Ferlini Micheli & Díaz., 2014, pág. 10)

Se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, principalmente en suelo, sedimentos marinos y en heces de diversos animales. Dentro de sus características específicas, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción del metabolito llamado geosmina, presentan una actividad metabólica alta, produciendo terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares (acción en el exterior de la célula) hidrolíticas (hidrolasas) y ligninolíticas con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal por lo cual son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo. (Salazar Loaiza & Ordóñez Guerrero, 2013, pág. 33).

1.6.1. Usos

Los Actinomicetos, en su ciclo de vida generan metabolitos secundarios, que son utilizados en diversas líneas de investigación, proporcionando una diversidad de productos que pueden ser utilizados en salud, Microbiología, Biotecnología, Agronomía, entre muchas otras áreas. (Brown & Peterson, 2008, págs. 44-47).

1.7. Biotransformación

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura define a la Biotecnología como: “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” (FAO, 1992).

Biotransformación es el proceso, donde un organismo vivo modifica una sustancia química transformándola en una diferente. Consiste en la utilización del poder catalítico de las enzimas, que intervienen en el metabolismo celular de los organismos vivos. Las reacciones metabólicas implicadas con frecuencia en el proceso de biotransformación, son: Oxidación, Hidroxilación, Desalquilación, Desaminación e Hidrolisis, todas ellas están catalizadas por enzimas específicas. (Repetto Jimenez & Repetto Kuhn, 2010, pág. 115).

1.7.1. Ventajas

Las ventajas de la biotransformación mencionadas por Fernández y Guash (2010, pág. 1) son las siguientes:

- **Especificidad de sustrato:** la enzima cataliza una única etapa específica de reacción.
- **Regioespecificidad:** afecta sólo a una posición específica de la molécula.
- **Estereoespecificidad:** sólo es transformado o sólo se produce un enantiómero.
- **Condiciones de reacción:** estas reacciones se realizan en condiciones suaves y poco agresivas para el medio ambiente.

La biotransformación de compuestos orgánicos, se realiza mediante cultivos en crecimiento, en los que, los microorganismos crecen de manera exponencial, obteniendo la máxima cantidad de biomasa, importante para que cuando estos se hayan acabado los nutrientes, se añada sustrato, impulsando a que produzcan metabolitos secundarios, importantes para su aplicación en la industria (Fernández & Guasch, 2010, pág. 2).

1.7.2. Importancia

La biotransformación, ha tenido especial éxito en la industria desde hace más de 6000 años, en el que se descubrieron dos términos básicos: la fermentación y catálisis. En 1833 fue descubierta la primera enzima por Anselme Payen y Jean Francois Persoz, y en 1878 se define enzima por Wilhelm Kühne. Las enzimas son compuestos de origen biológico (biocatalizadores), que tiene la capacidad de acelerar las reacciones químicas,

aumentando la velocidad de reacción en el que participen. Las enzimas ocupan un lugar importante en la síntesis orgánica que se refleja en las publicaciones realizadas sobre este tema, en donde contienen elementos de biotransformación (Catalán, 2007, pág. 155). Esto ha hecho en la actualidad, que la Biotecnología sea un tema de interés, debido a que gracias a ella, se han realizado diversos estudios, y en los que interviene la biotransformación, por ejemplo: Las biotransformaciones en la industria farmacéutica son múltiples, específicamente en síntesis y estudios metabólicos, en los que se han obtenido antibióticos, esteroides, alcaloides, aminoácidos, enzimas, hormonas, vacunas, entre otros.

La falta de alimentos, combustibles y la agudización de la polución ambiental han conducido a que numerosos residuos de la agricultura, agroindustrias, actividad forestal, industrias, animales y el hombre sean biotransformados y así obtener: moléculas de interés industrial, alimentos, energía, y disminuir la carga contaminante (Frioni, 2005, pág. 1). Un ejemplo es la biorremediación.

La utilización de microorganismos en la biotransformación ha tenido éxito en la producción de esteroides (ácido ursodesoxicólico, cortisona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, entre otros) (Roig, 2007, pág. 16).

Inicialmente el ácido ursodesoxicólico se producía mediante extracción de tejidos animales o mediante una síntesis química muy compleja, pero los dos procedimientos eran excesivamente costosos y contaminantes. Algunos pasos clave de la síntesis química pueden realizarse de forma más eficaz mediante el uso de enzimas. La mayoría de esteroides que se fabrican hoy en día se hacen mediante un proceso mixto de biotransformación microbiana y transformaciones químicas (Fernández & Guasch, 2010, pág. 3).

Capítulo 2 Metodología

2.1. Localización

Para realizar un correcto muestreo se tomó como referencia los siguientes puntos:

Localización de la zona de muestreo

Las zonas para tomar la muestra de actinomicetos fueron principalmente los suelos de camales y riberas de los ríos contaminados con desperdicios del proceso de faenamiento.

Localización geográfica

La ubicación de las zonas en donde se muestreó, se indica en la siguiente tabla:

Tabla 1.

Ubicación de las zonas de muestreo

Zona de muestreo	Ubicación
Camal de Sucúa	Se encuentra ubicado en la Provincia de Morona Santiago entre las calles Av. Sucúa y Kiruba, al sur occidente de Macas.
Ribera del río Machángra	Se encuentra ubicado en la Provincia de Pichincha al sur de Quito, sector Quitumbe, junto al Parque “Las Cuadras”.
Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco	Está ubicada en la zona de la comunidad Shuar, dividida de la ciudad de Macas por el Río Upano. Sevilla- Morona Santiago.

Nota: Elaborado por Calvachi M., 2015.

En las siguientes figuras se visualiza la ubicación en el mapa del camal de Sucúa, río Machángara y la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco:

Ubicación en el mapa del camal de Sucúa

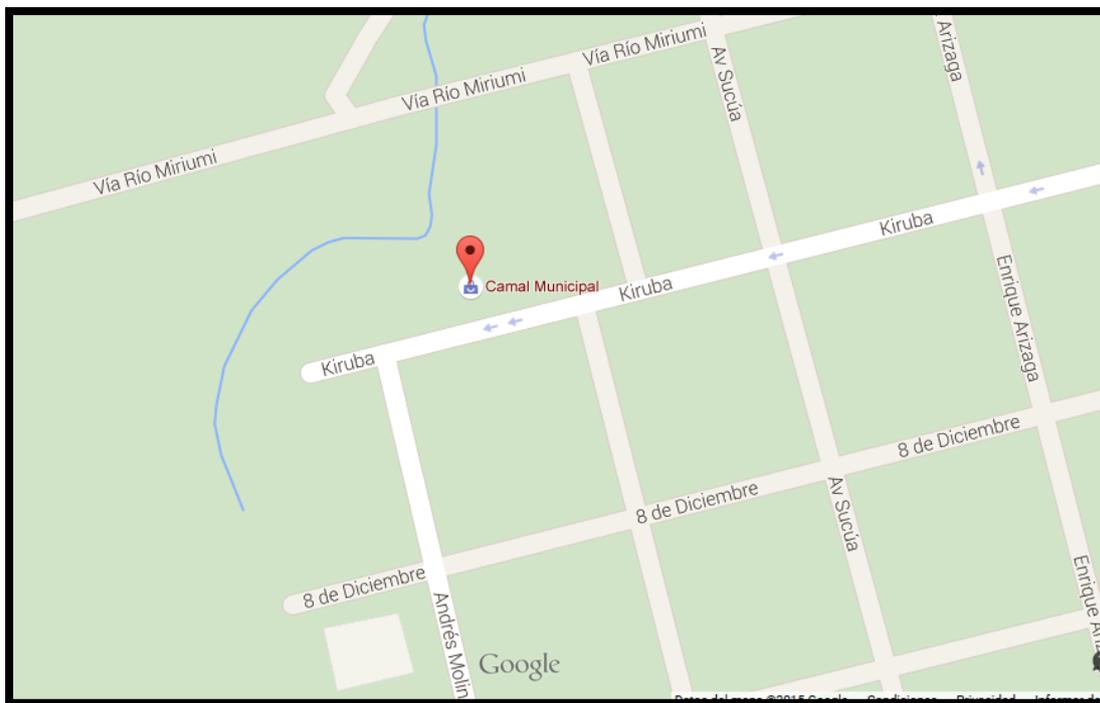


Figura 14.

Tomado de Google Maps

Ubicación en el mapa Río Machángara

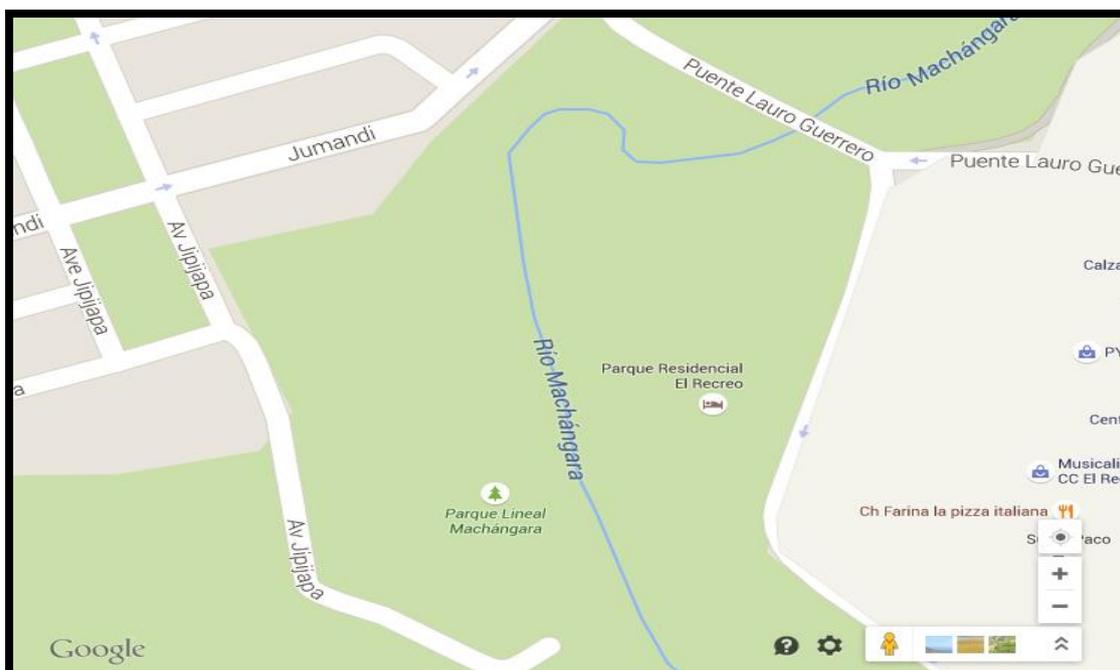


Figura 15.

Tomado de Google Maps

Ubicación en el mapa de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco.

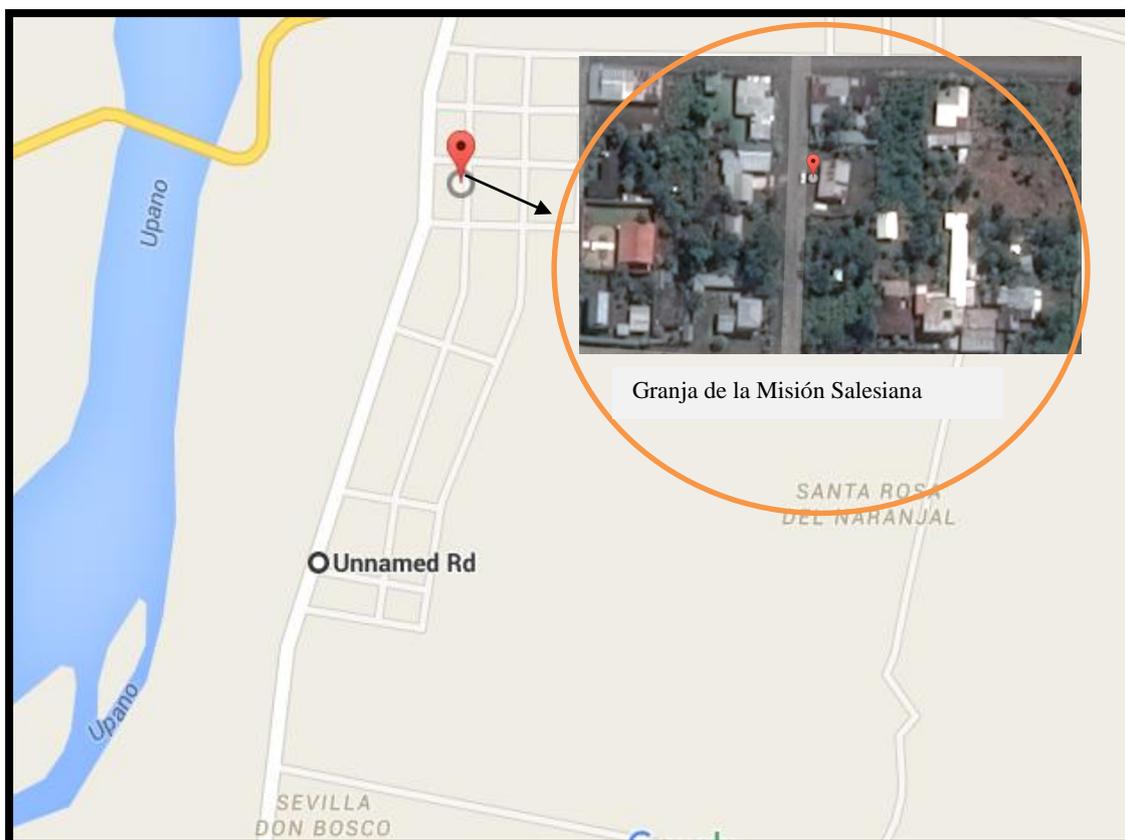


Figura 16.

Tomado de: Google Maps

2.2. Lugares de muestreo

El muestreo se realizó en el Camal de Sucúa, la granja de la Misión Salesiana Sevilla – Don Bosco y en la ribera del río Machángara, para cada uno se detallara a continuación el procedimiento, de su respectivo muestreo.

2.2.1. Muestreo camal de Sucúa

El muestreo se realizó en el establecimiento de faenamiento de reses. Se tomó en cuenta puntos críticos de contaminación. Los puntos de referencia muestreados dentro de este camal, se observa en la siguiente tabla:

Tabla 2.

Puntos específicos de muestreo del camal de Sucúa

Zona de muestreo	Puntos de referencia
Camal de Sucúa	Alcantarilla de agua con lavado de carne así como las vísceras.
	Canales de desagüe con líquido residual producto del faenamiento de reses.
	Área de procesamiento del animal
	Vertedero de agua residual originada por la limpieza de intestinos.
	Superficies de área de lavado y recolección de intestinos.
	Desagüe de la depuración del sacrificio animal.

Nota: elaborado por Calvachi M., 2015.

2.2.2. Muestreo de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco

El muestreo se realizó en la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco, debido a que posee diferentes animales como vacas, cerdos, caballos, gallinas, la cual por la generación de desechos, producidos por los mismos, hace que exista un alto grado de contaminación en el lugar, tanto en el agua como en el suelo. Los puntos de referencia muestreados dentro de este lugar, se observa en la siguiente tabla:

Tabla 3.

Puntos específicos de muestreo de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco

Zona de muestreo	Puntos de referencia	
<p align="center">Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco</p>	Limpieza cerdos	Pozo de vertedero del agua de limpieza
		Vertedero de agua procedentes de la depuración
	Establo	Planta de lavado de ganado
		Desechos Biológicos de ganado
		Pozo de vertedero del agua de limpieza
	Canal de residuos	
	Depósito de agua	Efluente que contiene todas las aguas, provenientes de todas las partes de la granja.

Nota: elaborado por Calvachi M., 2015.

2.2.3. Muestreo de la ribera del río Machángara

El muestreo se realizó en la ribera del río Machángara, el cual posee un alto grado de contaminación, debido a que existen depósitos de desechos domésticos e industriales, considerando al camal municipal, el principal contaminante de este río, debido a que todos los residuos son descargados en este lugar. Para la muestra se tomó como referencia 1m² de la superficie de la ribera del río, así como la entrada, al centro y salida del parque. Los puntos de referencia muestreados en el río se observa en la siguiente tabla:

Tabla 4.

Puntos específicos de muestreo de la ribera del río Machángara

Zona de muestreo	Puntos de referencia	
Ribera del río Machángara	Entrada del parque	Pocillo de Agua estancada
		Zona fangosa
		Creciente de la turbulencia del río
		Fuente de agua contaminada estancada
	Centro del parque	Curso de una curva de arena del río
	Salida del parque	Corriente situada antes de su entrada a la ciudad

Nota: elaborado por Calvachi M., 2015.

2.2.4. Metodología

La metodología se dividió en cuatro fases descritas a continuación:

2.2.4.1. FASE I: Muestreo

El método de muestreo mencionado a continuación, se aplicó en los tres sitios seleccionados. En el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, se realizó el siguiente procedimiento:

- Preparación del material: se esterilizaron tubos de ensayo con tapa rosca, conteniendo 5 ml de solución fisiológica (NaCl, 0.9 %) e hisopos de algodón; tubos de ensayo con tapa rosca y pipetas de 10 ml y 20 ml. En el lugar de muestreo se realizó el siguiente procedimiento:

- Toma de muestras: en condiciones de asepsia, se tomó el tubo de ensayo con el hisopo embebido en solución salina estéril y se retiró el hisopo, se pasó por la superficie de cada lugar mencionado en el punto 2.3, tanto para el camal, la granja y en la ribera del río Machángara; se colocó el hisopo con la muestra en el tubo de ensayo y se tapó para mantener la esterilidad. Para las muestras líquidas se utilizó las pipetas, se tomó 10 ml de muestra, se colocó en los tubos de ensayo y se tapó.
- Transporte de muestras: Las muestras tomadas, se almacenaron en el cooler, a una temperatura de 4°C, y fueron llevadas al Laboratorio de Ciencias de la Vida.

2.2.4.2. *FASE II: Aislamiento y purificación*

En esta fase se describe la dilución de muestras, la preparación de medios de cultivo, cultivo de microorganismos, aislamiento y purificación de cepas, así como la conservación de microorganismos.

2.2.4.2.1. *Dilución de muestras*

En condiciones de asepsia, se preparó 10 tubos de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada, para realizar diluciones desde la 10^{-1} hasta 10^{-10} . Se tomó 1ml de muestra, se colocó en el tubo de ensayo correspondiente a la dilución 10^{-1} , se agitó y de éste se tomó 1 ml y se colocó en el siguiente tubo de ensayo, correspondiente a la dilución 10^{-2} , así hasta llegar a la dilución 10^{-10} ; se utilizó las diluciones 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} , debido a que en éstas se obtiene colonias asiladas de Actinomicetos. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras.

2.2.4.2.2. *Preparación de medios de cultivo*

Se utilizó medio sólido Columbia Agar Base marca DB DIFCO (anexo 4).

Para la preparación del medio cultivo DB DIFCO Columbia Agar Base, se tomó el procedimiento mencionado por el fabricante y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

2.2.4.2.3. Procedimiento para el uso del antibiótico ACTINOMYCETE SELECTATAB™

El procedimiento para el uso de estas tabletas descrito por Mast Group (2015), es el siguiente: se esterilizó el volumen apropiado de Columbia agar y cuando estuvo aproximadamente a una temperatura de 50-55°C, se añadió una tableta por cada litro de preparación del medio de cultivo, se agitó hasta que la tableta se disolvió y se vertió en cajas Petri.

El antibiótico ACTINOMYCETE SELECTATAB™, está formulado por los principios activos descritos en el anexo 5.

2.2.4.2.4. Cultivo de microorganismos

En cada caja Petri, se colocaron 20 ml de medio Columbia agar, después de su solidificación, se colocó una alícuota de 1 ml de las diluciones seleccionadas, mencionadas anteriormente y utilizando el método de dispersión se sembró. Con la ayuda de un asa de Drigalsky, se cubrió toda la caja. Se incubó a 29 °C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se seleccionó los microorganismos que crecieron en las cajas Petri, de una forma aleatoria y se colocó un código con el siguiente criterio MMAE-1; M: María; M: Maldonado; A: Actinomicetos; E: Ecuador; N° (1, 2, 3,...): Número de Cepa asignado.

2.2.4.2.5. Aislamiento y purificación de cepas

Se efectuó el aislamiento y purificación de cepas de la siguiente forma: se tomó cada unidad formadora de colonia (UFC) y mediante el método del estriado, se procedió a sembrar con un asa de cultivo, se inoculó en nuevas cajas Petri conteniendo agar Columbia; se incubó a 29 °C, entre 24 y 48 horas; este procedimiento se realizó hasta obtener cepas puras aisladas. A estas cepas se les asignaron los códigos finales, con el mismo criterio mencionado anteriormente y se colocaron en refrigeración a 4 °C.

2.2.4.2.6. Conservación de microorganismos

Para la conservación de las cepas se preparó tubos conteniendo agar Columbia, pico de flauta, por duplicado y se procedió a inocular las cepas puras obtenidas, se incubaron a 29 °C entre 24 y 48 horas, en función de la velocidad de su crecimiento; luego se colocaron en refrigeración a 4 °C y se mantuvieron por un tiempo máximo de 3 meses.

Transcurrido este tiempo se volvió a realizar el mismo procedimiento con el fin de mantener puras las cepas.

2.2.4.3. *Fase III: Selección microbiológica*

En esta fase se detalla la preparación del medio de cultivo líquido ATT, evaluación de la capacidad de biotransformación, análisis de la muestra por TLC, escalamiento de cultivo, extracción de los productos de la biotransformación, cromatografía preparativa y la tinción de Gram para actinomicetos.

2.2.4.3.1. *Preparación del medio de cultivo líquido ATT*

Se preparó medio líquido ATT (abreviatura para Actinomicetos), diseñado por el grupo de investigación dirigido por el Profesor Alessandro Medici de la Universidad de Ferrara, cuya fórmula es:

Tabla 5.

Formulación del medio líquido ATT; cantidad suficiente para 1 litro de preparación

Extracto de carne	5 mg
Triptona	8 mg
Peptona - caseína	10 mg
NaCl	0.5 mg
Almidón	1 mg

Nota: elaborado por Paola Pedrini et. al, 2014

El procedimiento señalado por el grupo de investigación dirigido por el Profesor Alessandro Medici fue el siguiente:

- Se suspendió los componentes mencionados en la tabla 9, en 1 litro de agua purificada.
- Calentar, agitando frecuentemente y hervir hasta disolver completamente los componentes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Enfriar de 50 a 45 °C, para su posterior uso.

2.2.4.3.2. Evaluación de la capacidad de biotransformación

Se prepararon Erlenmeyers conteniendo 20 ml de caldo ATT. Por cada Erlenmeyer, se sembró una cepa diferente y se colocó en la incubadora con agitación a 29 °C a 150 rpm, entre aproximadamente 24 y 48 horas, dependiendo de la velocidad de su crecimiento y en función de la turbidez que alcanza.

Una vez transcurrido este tiempo, a cada Erlenmeyer, se añadió 400 µl de solución de la sal sódica del ácido cólico, con una concentración de 20 ppm y se mantuvo en la incubadora con agitación a una temperatura de 29 °C a 150 rpm, durante 48 y 72 horas.

2.2.4.3.3. Análisis de la muestra por TLC

Se tomó 350 µl del caldo de cultivo líquido en crecimiento y se colocó en tubos Eppendorf, a los que se añade 300 µl de acetato de etilo (C₄H₈O₂) y 100 µl de ácido clorhídrico (HCl) 1,0 M y se agitó.

De cada tubo Eppendorf, se tomó con un capilar una fracción del sobrenadante (acetato de etilo) y se utilizó placas cromatográficas, de marca ANALTECH, cuyas especificaciones son las siguientes: placas de vidrio (20 x 20 cm), compuestas por sílica gel, con aglutinante inorgánico e indicador de fluorescencia. En las placas cromatográficas, se sembró el estándar de referencia del ácido cólico y las muestras de biotransformación; por cada siembra, se realizó de 3 a 4 aplicaciones superpuestas, dejando que se seque por cada aplicación. Se colocó la placa en la cámara cromatográfica, conteniendo la fase móvil compuesta por acetato de etilo (C₄H₈O₂) y ácido acético (C₂H₄O₂), 50:2 respectivamente y se dejó correr el disolvente en la placa, hasta aproximadamente 1 cm antes del borde superior de la misma; se sacó la placa de la cámara cromatográfica y se dejó evaporar el solvente en una sorbona.

Para el revelado de la placa, se utilizó una solución reveladora, con los siguientes ingredientes: 10 g de ácido fosfomolibdico (H₃[P(Mo₃O₁₀)₄]), 200 ml de ácido acético

($C_2H_4O_2$) y 5.5 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4). Se roció totalmente a la placa cromatográfica con la solución reveladora y se calentó en una plancha de calentamiento a una temperatura de 100 °C. Se observó y analizó las manchas de color azul, que se generan luego del calentamiento. Este procedimiento se realizó cada 24 horas, por un periodo máximo de 3 días, para cada una de las 53 cepas.

2.2.4.3.4. *Escalamiento del cultivo*

Se eligió a las cepas con mayor capacidad de biotransformación, para realizar el escalamiento del cultivo. En esta parte, se realizó el mismo procedimiento mencionado en los puntos anteriores a un volumen de 200 ml.

Para preparar el inóculo bacteriano, se preparó Erlenmeyers conteniendo 20 ml de caldo de cultivo ATT estéril. En cada Erlenmeyer, se inoculó una cepa diferente y se mantuvo en una incubadora con agitación, a una temperatura de 29 °C a 150 rpm, durante 24 horas. Luego de este tiempo, se transfirió este cultivo a los Erlenmeyers conteniendo 200 ml de caldo de cultivo ATT estéril y se puso en la incubadora con agitación a las mismas condiciones mencionadas, durante 72 horas, para obtener mayor cantidad de biomasa.

Posteriormente, se colocó 4 ml, 2g de la sal sódica del ácido cólico, por cada Erlenmeyer y se realizó la TLC, 3 veces cada 2 horas, durante 5 días, con el fin de controlar el proceso de biotransformación de cada cepa seleccionada. Es importante mencionar que, se mantuvo a cada Erlenmeyer conteniendo la muestra de caldo de cultivo, a las mismas condiciones de crecimiento, ya establecidas en el punto 2.2.4.3.2.

2.2.4.3.5. *Extracción de los productos de la biotransformación*

Se centrifugó el contenido de los Erlenmeyers en tubos Falcon (50 ml de capacidad), a 300 rpm, durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se descartó el pellet bacteriano; el sobrenadante se colocó en un embudo de separación y se añadió ácido clorhídrico concentrado (HCl), con el fin de acidificar el medio para que en presencia del ácido clorhídrico, se libere el ácido biliar (ácido cólico) y sus productos de biotransformación, luego con extracciones sucesivas con acetato de etilo ($C_4H_8O_2$), se recuperó la mayor cantidad del producto de la biotransformación. La fracción de acetato de etilo se vertió en un vaso de precipitación.

A la fracción obtenida, se añadió sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), para eliminar las trazas remanentes. Se dejó agitado durante 5 minutos y se filtró. Con la ayuda del rotavapor

modelo IKA RV10 BASIC, se eliminó el acetato de etilo, quedando los productos de la biotransformación libres de solvente.

2.2.4.3.6. *Cromatografía preparativa*

Se llevó a cabo la cromatografía preparativa a los productos de la biotransformación obtenidos, que fueron identificados previamente por TLC, para luego aislar el compuesto de interés resultante de la biotransformación.

La cromatografía en columna se realizó en tres pasos; preparación de la columna: se colocó la fase estacionaria (silica gel) en un matraz, se colocó la fase móvil (acetato de etilo ($C_4H_8O_2$)) y se mezcló. Este contenido se añadió a una columna de vidrio vertical y se abrió la llave de la columna para que el solvente fluyera, por toda la columna. Es importante mencionar que, durante el proceso cromatográfico, la columna no debió secarse, es decir, en todo momento debió estar cubierta la sílica gel por el solvente;

Depósito de los productos de la biotransformación obtenidos: se disolvió los productos de la biotransformación y luego se vertió en la columna vertical con la ayuda de un pipeta Pasteur, se abrió la llave de la columna y se dejó fluir hasta que el solvente quedado a una altura aproximada de 1 mm sobre la superficie de la silica gel y se cerró la llave. Se adicionó la fase móvil compuesta por etil acetato y ácido acético en una proporción de 50:2, se abrió la llave de la columna y se recogieron fracciones de aproximadamente 2 ml en tubos de vidrio, los cuales fueron previamente numerados, hasta que todo el producto se haya recogido; se realizó la TLC a las fracciones tomadas en orden, con el fin de identificar, el momento en el que se separan los productos de interés. Este procedimiento permite que cada uno de los componentes, fueran transportados a diferentes velocidades, consiguiendo así su separación. Los líquidos (productos) separados, se colocó en frascos de vidrio pequeños, se concentraron en el rotavapor y se secó con gas nitrógeno, para eliminar las trazas de acetato de etilo que hayan quedado, con el fin de que esto no alteren los resultados de la resonancia magnética; obteniendo así, los productos de interés purificados.

Las muestras así obtenidas, se enviaron a los laboratorios de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), para su identificación mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se analizó en función del espectro: forma, tamaño y cantidad de picos.

2.2.4.4. *Tinción de Gram para Actinomicetos*

Se realizó la tinción diferencial de Gram para Actinomicetos.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. De las zonas de muestreo

A nivel nacional existen alrededor de 200 camales, la mayoría se encuentran ubicados en la costa (45%), es la sierra (38%) y la región amazónica e insular (17%). El (INEC ESPAC, 2011, pág. 10), estima que alrededor de 15.6 millones de litros de sangre, 48.138 T de contenido ruminal y 19.255 T de estiércol de los corrales se generan al año, los mismos que son desechados. Esto indica que, la generación de desechos producidos, es de gran magnitud, debido a que Ecuador no cuenta con la tecnología, conocimientos y recursos económicos suficientes, para poder dar un tratamiento oportuno a estos residuos.

En el camal de Sucúa se observó, que existe gran cantidad de desechos sólidos y líquidos, además, el lugar no aplica las normas técnicas y de higiene correctas para manejar los desechos provenientes del proceso de faenamiento, produciendo un alto grado de contaminación, esto concuerda con lo que mencionan (Pacheco Guevara & Acosta Herrera, 2014), que por lo general en el Ecuador, los centros pequeños de sacrificio animal, producen subproductos que son generalmente vertidos en los desagües o son depositados en ríos o riberas, generando un gran peligro ambiental.

Los resultados obtenidos en la granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco, son similares a los obtenidos en el camal, debido a que los animales generan alta cantidad de residuos, en los que resalta el estiércol. Se observó que existe aguas residuales provenientes de las zonas de los corrales y desechos de productos lácteos, estos residuos al no tener un tratamiento generan contaminación y es corroborado por (Barahona Paz y Miño & Salas Vernis, 2013), que mencionan, que los desechos de origen animal generados en granjas, están relacionados con la intensidad, es decir, mientras mayor es la intensidad del sistema mayor es la cantidad de residuos generados, convirtiendo en un problema potencial.

Los resultados encontrados en el río Machángara son, que la cantidad de desechos arrojados en este río son considerablemente altos, ya que en este lugar se descargan residuos domésticos (80%) e industriales (20%), siendo la Empresa Pública Metropolitana de Rastro (EPMRQ), la que vierte más residuos en esta zona. Esto ha generado malos olores, afectación a la fauna y flora y la proliferación de coliformes, ratificado por (Reinoso Chisaguano, 2015, pág. 14), que menciona, que las aguas

residuales domésticas son descargados sin previo tratamiento, en el río Machángara, considerando que es crítico para el entorno, debido a que genera un impacto ambiental alto (contaminación de agua).

La EPMRQ, ha tomado medidas ante esta situación y han decidido aprovechar la mayoría de estos residuos para elaborar subproductos, entre estos se encuentra la harina de sangre, derivada de la recopilación de la sangre de los animales faenados, que por su alto porcentaje de proteína (75%), es apto para la alimentación de animales. Por otro lado (Daza Vélez & Pineda Chavez, 2014, pág. 48), mencionan que en esta empresa utilizan un biodigestor, mediante el cual se obtiene fertilizantes orgánicos, de uso agrícola. Y por último la obtención de la bilis del ganado bovino, en el que el ácido cólico es igual o superior al 40% con una humedad no mayor al 25%, se vende a un precio de 12 dólares por gramo a empresas coreanas y colombianas, generando un mercado de alrededor de 10.000 dólares al año (Daza Vélez & Pineda Chavez, 2014, pág. 49).

Se encontró además que estas zonas de muestreo, incumplen con las normativas, leyes, ordenanzas, y reglamentos. La ley de mataderos, menciona en el artículo 8, literal e), que el lugar debe contar con “salas independientes para la recolección y lavado de vísceras, pieles, cabezas y patas; área de oreo y refrigeración de los canales. Todas estas dependencias con paredes de material impermeable, pisos antideslizantes de fácil higienización. Baterías sanitarias, duchas, lavamanos, vestidores. Canales de desagüe y recolección de sangre” y en el literal f), que deben tener un tanque para el tratamiento de las aguas servidas. El ministerio de ambiente mediante el reglamento para la prevención y control de la contaminación por sustancias químicas peligrosas, desechos peligrosos y especiales, controla la generación, almacenamiento, recolección, transporte y sistemas de eliminación y disposición final de estos residuos.

3.2. Del aislamiento y purificación de Actinomicetos

De los muestreos realizados en el camal de Sucúa, la granja de la Misión Salesiana y la ribera del río Machángara, se obtuvieron un total de 53 cepas puras, distribuidas de la siguiente forma: 37 cepas obtenidas del camal de Sucúa, que representa el 69.81%, 3 cepas de la granja de la Misión Salesiana (Morona Santiago), representando el 5,66% y 13 cepas de la ribera del río Machángara (Pichincha), ocupando el 24,52% del total de las cepas. Estos resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 6.

Cepas de actinomicetos obtenidos del camal de Sucúa

CÓDIGO DE CEPA ASIGNADO MMAE-		
16A	16B	16C
16D	17A	17B
17C	17D	18A
19A	19B	19C
19D	19E	20B
21A	21B	21C
21D	22A	22B
22C	22D	23A
24A1	24A2	25A
25B	25C	26B
26C	26D	27A
28A	28B	28C
29A		

Nota: elaborado por Calvachi M., 2015.

Tabla 7.

Cepas de actinomicetos obtenidos de la Granja de la Misión Salesiana

CÓDIGO DE CEPA ASIGNADO MMAE-		
29B	30A	30B

Nota: elaborado por Calvachi M., 2015.

Tabla 8.

Cepas de actinomicetos obtenidos de la ribera del río Machángara

CÓDIGO DE CEPA ASIGNADO MMAE-		
1A	4A	6A
7A	8A	9A
10A	10B	11A
12A	13A	14A
15A		

Nota: elaborado por Calvachi M., 2015.

3.3. De la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico por Actinomicetos aislados

En la evaluación de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico, por parte de las 53 cepas aisladas de Actinomicetos, se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en las tablas 10, 11, 12, en las que se indican, el porcentaje de biotransformación de cada cepa en función del tiempo, por cada lugar de muestreo.

Es importante mencionar que, el porcentaje de biotransformación, se obtuvo a través de la intensidad de la mancha que se observó en la placa cromatográfica.

Porcentaje de biotransformación, determinada por intensidad de la mancha.

<p>0-25%: la intensidad de la mancha a nivel del estándar del ácido cólico se muestra intensa, también se puede observar una ligera mancha sobre el estándar.</p>	<p>25 – 50%: la intensidad de la mancha a nivel del estándar del ácido cólico disminuye y a la misma vez se observa que la mancha superior a ésta, se muestra con mayor intensidad, debido a que hay presencia de un producto con alta concentración.</p>
<p>50 – 75%: la mancha a nivel del estándar empieza a desvanecerse y la mancha del producto que se encuentra superior a ésta, disminuye su intensidad.</p>	<p>75 – 100%: no hay presencia de manchas, debido a que la cepa ha consumido toda la sal del ácido cólico, ya que la ha usado como fuente de carbono, produciendo dióxido de carbono.</p>

Figura 17.

Elaborado por Calvachi M., 2015.

Tabla 9.

Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico de cada cepa aislada del camal de Sucúa

HORAS DE CONTROL	24				48				72			
% BIOTRANSFORMACIÓN	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
CÓD. CEPA												
MMAE-16A	X				X				X			
MMAE-16B												
MMAE-16C												
MMAE-16D												
MMAE-17A	X				X							X
MMAE-17B	X				X							X
MMAE-17C	X				X							X
MMAE-17D	X				X				X			
MMAE-18A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-19A	X				X				X			
MMAE-19B	X				X				X			
MMAE-19C												
MMAE-19D	X				X							X
MMAE-19E	X					X						X
MMAE-20B	X					X						X
MMAE-21A	X				X							X
MMAE-21B												
MMAE-21C												
MMAE-21D												
MMAE-22A												
MMAE-22B												
MMAE-22C	X				X							X
MMAE-22D												
MMAE-23A												
MMAE-24A1												
MMAE-24A2												
MMAE-25A												
MMAE-25B	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-25C	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-26B	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-26C	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-26D	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-27A												
MMAE-28A												
MMAE-28B												
MMAE-28C												
MMAE-29A	X					X						X

Nota: El símbolo / significa que los actinomicetos no presentaron crecimiento, las celdas en blanco indican que la cepa no biotransforma la sal sódica de ácido cólico.

Elaborado por Calvachi, M., 2015.

Tabla 10.

Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico, de cada cepa aislada de la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco.

HORAS DE CONTROL	24				48				72			
% BIOTRANSFORMACIÓN	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
CÓD. CEPA												
MMAE-29B	X					X						X
MMAE-30A												
MMAE-30B												

Nota: El símbolo / significa que los actinomicetos no presentaron crecimiento, las celdas en blanco indican que la cepa no biotransforma la sal sódica de ácido cólico.

Elaborado por Calvachi M., 2015.

Tabla 11.

Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico, de cada cepa aislada de la ribera del río Machángara.

HORAS DE CONTROL	24				48				72			
% BIOTRANSFORMACIÓN	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
CÓD. CEPA												
MMAE-1A	X					X					X	
MMAE-4A												
MMAE-6A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-7A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-8A	X				X				X			
MMAE-9A	X				X				X			
MMAE-10A												
MMAE-10B												
MMAE-11A	X				X				X			
MMAE-12A	X				X				X			
MMAE-13A												
MMAE-14A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MMAE-15A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Nota: El símbolo / significa que los actinomicetos no presentaron crecimiento, las celdas en blanco indican que la cepa no biotransforma la sal sódica de ácido cólico.

Elaborado por Calvachi M., 2015.

De las 53 cepas aisladas, 13 (24.53%) Actinomicetos biotransforman la sal sódica del ácido cólico en un porcentaje del 50 – 100%; 10 cepas pertenecen al camal de Sucúa, 1 cepa a la Granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco y 2 cepas a la ribera del Río Machángara, esto coincide con la investigación realizada por otros investigadores (Daza Vélez & Pineda Chavez, 2014), en la que evalúan la capacidad de biotransformación de las sales de ácidos biliares: colato y dehidrocolato de sodio, por microorganismos (bacterias y hongos) en dos camales de la sierra ecuatoriana, encontrando que de un total de 47 microorganismos, 13 bacterias poseen un porcentaje de 50 – 100% de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico y ningún hongo posee un porcentaje representativo de biotransformación de la sal biliar.

Las cepas MMAE – 18A, MMAE – 25B, MMAE – 25C, MMAE – 26B, MMAE – 26C, MMAE – 26D, MMAE – 6A, MMAE – 7A, MMAE – 14A, MMAE – 15A, no presentaron crecimiento hasta las 72 horas de evaluación, por lo que se asume que necesitaron más tiempo de incubación para su desarrollo, esto es corroborado por (Winn, y otros, 2008, pág. 164), menciona que la mayoría de microorganismos aislados se desarrollan dentro de 1 a 2 días, pero ciertos microorganismos como los Actinomicetos pueden tomar un tiempo considerablemente más largo.

3.4. De la selección de las cepas con mayor capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico

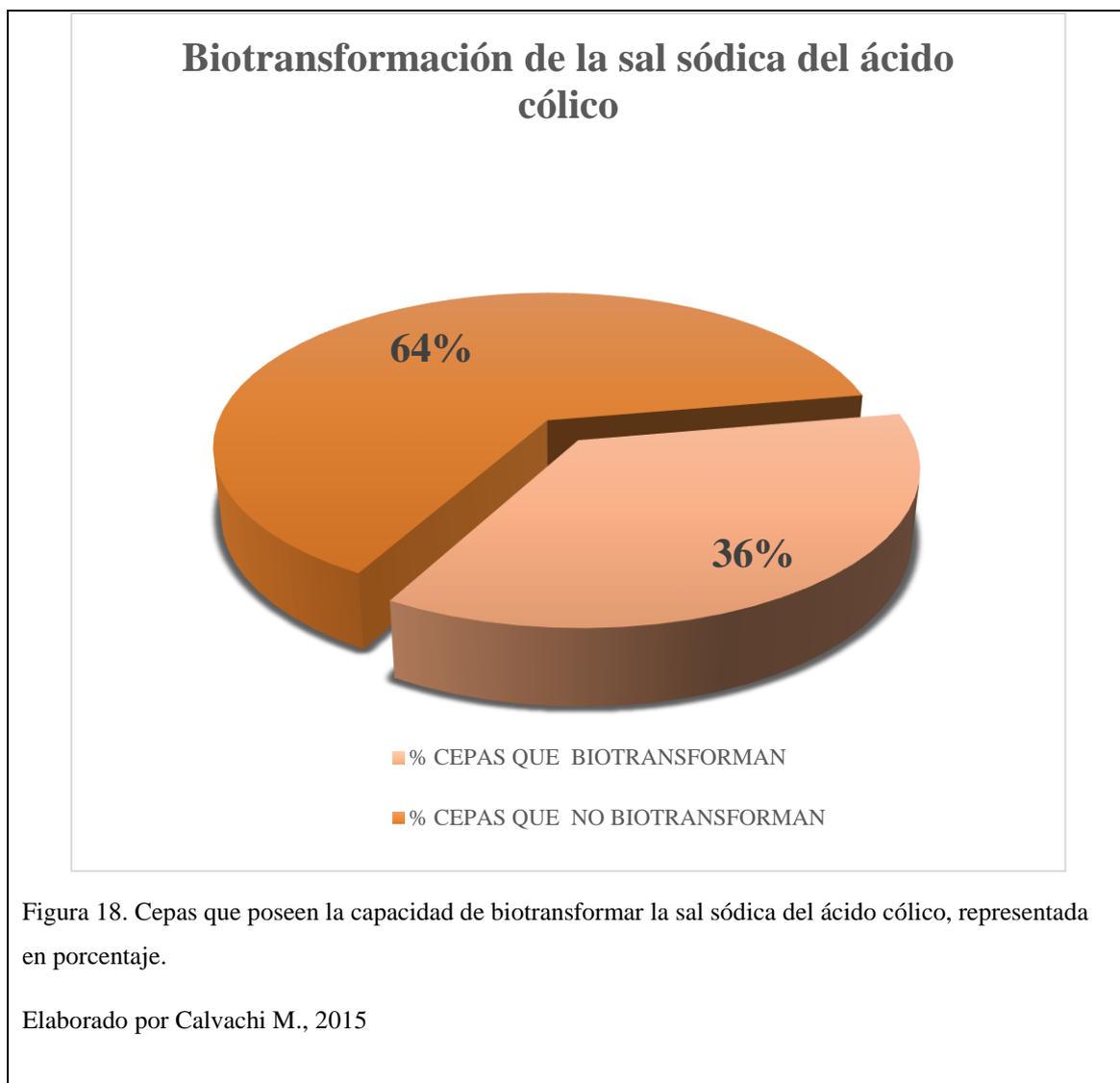
Tabla 12.

Número de cepas que poseen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico.

N°	CÓDIGO DE CEPA	ORIGEN
1	MMAE-16A	CAMAL SUCÚA
2	MMAE-17A	
3	MMAE-17B	
4	MMAE-17C	
5	MMAE-17D	
6	MMAE-19A	
7	MMAE-19B	
8	MMAE-19D	
9	MMAE-19E	
10	MMAE-20B	
11	MMAE-21A	
12	MMAE-22C	
13	MMAE-29A	
14	MMAE-29B	GRANJA DE LA MISIÓN SALESIANA
15	MMAE-1A	RIBERA DEL RÍO MACHÁNGARA
16	MMAE-8A	
17	MMAE-9A	
18	MMAE-11A	
19	MMAE-12A	

Nota: elaborado por Calvachi M., 2015.

Se observó que el 36% del total de las cepas, es decir, 19 de los 53 Actinomicetos aislados, poseen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico, representado en el siguiente gráfico:



Al tomar como referencia, las tablas 14, 15 y 16, se seleccionaron tres cepas, las cuales obtuvieron el mayor porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico. Las cepas, que se mencionan a continuación, se usaron para trabajar en la fase de escalamiento. En esta fase se observaron los siguientes porcentajes de biotransformación.

Tabla 13.

Porcentaje de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico, en la fase de escalamiento del cultivo.

N°	CÓDIGO DE CEPA	% BIOTRANSFORMACIÓN	ORIGEN
1	MMAE-20B	75-100	CAMAL SUCÚA
2	MMAE-22C	75-100	
3	MMAE-1A	75-100	RIBERA RÍO MACHÁNGARA

Nota: Elaborado por Calvachi M., 2015.

Placas cromatográficas de las cepas MMAE-20B, MMAE-22C, MMAE-1A en la fase de escalamiento del cultivo.

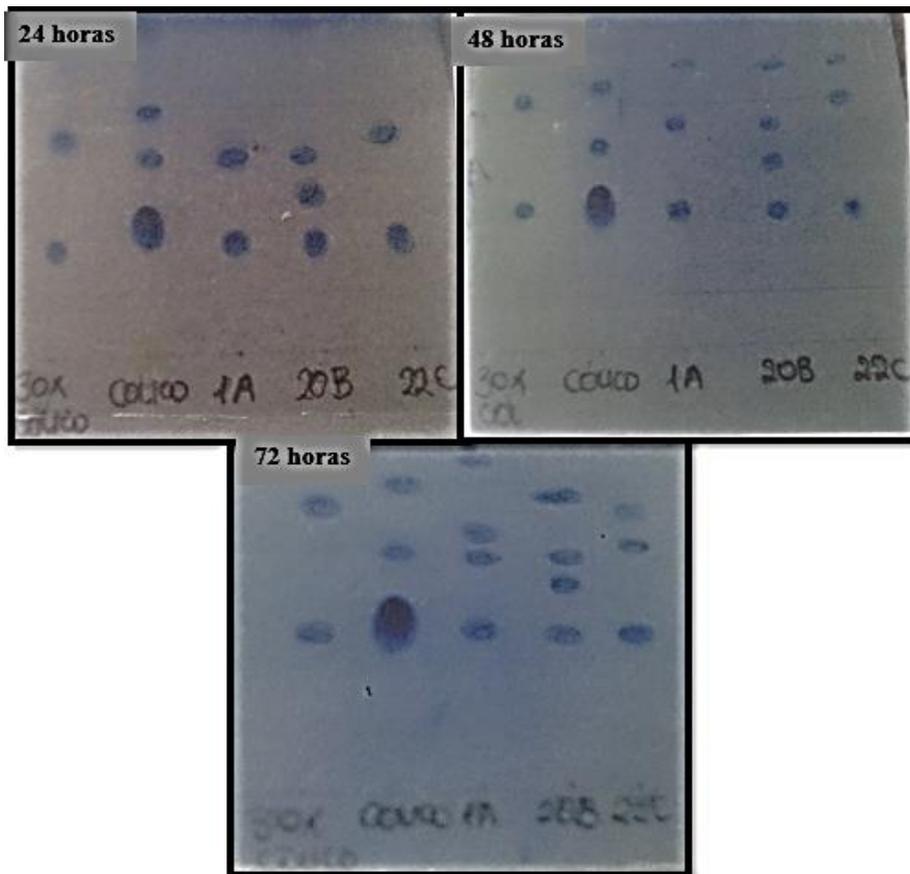


Figura 19.

Elaborado por Calvachi M., 2015.

En la figura 19, se muestra las manchas en la placa cromatográfica de las cepas seleccionadas a las 24, 48 y 72 horas de control, en la que se indica: el estándar de referencia: el ácido cólico oxidado en la posición del carbono 3 (3 Ox); el estándar del ácido cólico y las cepas con su respectivo código.

A las 72 horas, siendo la última evaluación por cromatografía, se obtuvo: 4 productos de la cepa MMAE-1A, 4 productos de la cepa MMAE-20B y 3 productos de la cepa MMAE-22C. En todas las cepas es predominante la biotransformación que oxida el carbono 3 (C₃) del ácido cólico, debido a que el mismo nos da una pauta para llegar a la ruta de la biosíntesis del ácido ursodesoxicólico, esto es corroborado con (Giovannini, Grandini, Perrone, Pedrini, Fantin, & Fogagnolo, 2008, págs. 1387-1389), mencionan que la oxidación regioselectiva del grupo OH del ácido cólico en la posición C-3, es una pauta para llegar a la síntesis del ácido ursodesoxicólico, pero indican además que lo ideal es encontrar microorganismos que oxiden en las posiciones C-7 y C-12, con el fin de encontrar las enzimas 7 α y 12 α -hidroxiesteroide deshidrogenasas (HSDH), que son de gran importancia para su síntesis.

3.5. De la extracción de los productos de la biotransformación

Se escogieron los productos de la biotransformación de la cepa MMAE-22C, debido a que es, la que mayor porcentaje de ácido cólico en la posición 3 generó.

A partir de 241 mg (peso total de los productos de la biotransformación de esta cepa) y mediante una columna preparativa (placas de vidrio (40 x 40 cm), compuestas por silica gel, posee aglutinante inorgánico y sin indicador de fluorescencia; eluyente: acetato de etilo / ácido acético 50: 2), se obtuvieron los siguientes productos, expresados en la figura a continuación:

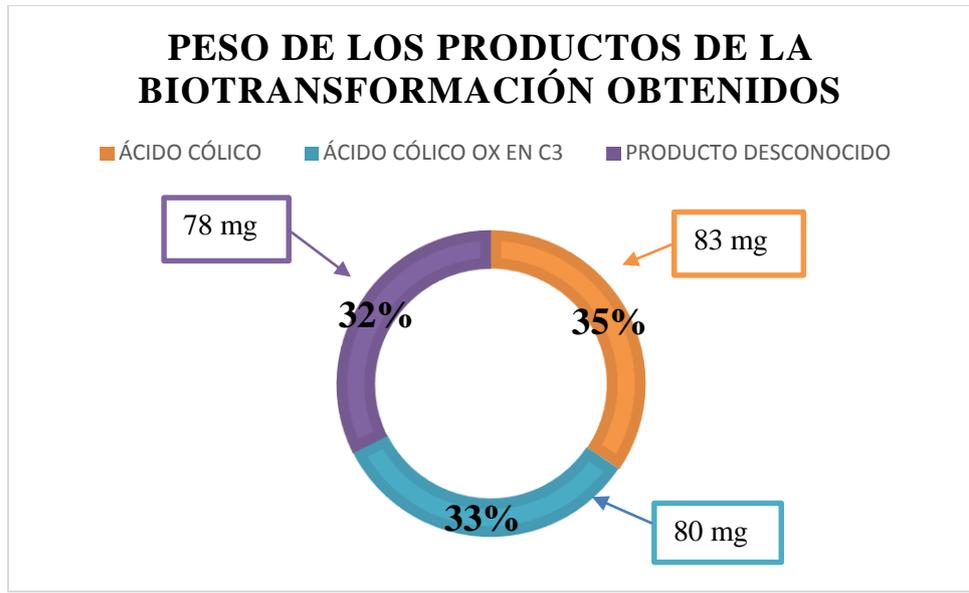


Figura 20. Productos de la biotransformación de la sal sódica del ácido cólico por parte de la cepa MMAE-22C.

Elaborado por Calvachi M., 2015.

Los productos de la biotransformación obtenidos, nos indicaron que se logró recuperar todo el producto de la columna cromatográfica, ayudando a que el análisis por resonancia magnética, dé los resultados esperados.

3.6. De la interpretación de los espectros RMN

Mediante la técnica $H^1 - NMR$, se identificó que el producto de interés (producto de oxidación en C_3), corresponde al ácido 3-ceto-cólico. El espectro del ácido mencionado mostró las siguientes señales: ^1H-RMN (CD_3OD), cuyos picos seleccionados fueron: δ : 0.80 (s, 3H-18), 1.05 (s, 3H-19), 1.05 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H-21), 3.90 (m, 1H, H-7), 4.05 (m, 1H, H-12). El espectro correspondiente a este ácido se visualiza en el Anexo 1 y Anexo 2.

En el anexo 3 y anexo 4, se encuentran las características espectroscópicas del ácido cólico.

3.7. Tinción de Gram de la cepa MMAE-22C

Los Actinomicetos son organismos que se encuentran en el límite de los hongos y bacterias, y por esta razón no se logró encontrar un kit específico para la identificación

de las mismas, por lo que se optó en realizar la Tinción de Gram. Mediante esta prueba se encontró que la cepa MMAE-22C es una célula Gram -, debido a que su envoltura celular está compuesta por una membrana citoplasmática, una pared celular delgada formada por péptidoglicano y una membrana externa que recubre la pared celular, corroborado por (Cavalier, 2006, pág. 997), menciona que las Gram negativas, presentan una capa muy delgada de péptidoglicano, como para poder retener el complejo de cristal violeta/ yodo, por lo tanto este complejo se escapa y no se tiñe de azul - violácea. Los rasgos morfológicos de la cepa MMAE-22C, indicaron que: la forma es fusiforme, la superficie es planoconvexa y el borde es entera

Tinción de Gram de la cepa MMAE-22C



Figura 21.

Elaborado por Calvachi M., 2015.

Conclusiones

- La presencia de ácidos biliares y sus sales en las muestras de Actinomicetos obtenidas de: el camal de Sucúa, la granja de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco (Morona Santiago) y la ribera del río Machángara (Pichincha), son aprovechados por los mismos para su crecimiento y producción de metabolitos secundarios de interés; indicando que la selección de estos lugares de muestreo, fueron adecuados.
- Se aisló y purificó 53 cepas de Actinomicetos, de las cuales 37 cepas fueron del camal de Sucúa, 3 cepas de la Misión Salesiana de Sevilla Don Bosco y 13 de la Rivera del Río Machángara.
- Se obtuvo que, de 53 cepas aisladas de Actinomicetos, 19 de ellas, que representan el 35.8%, poseen la capacidad de biotransformar la sal sódica del ácido cólico y que 7 de ellas que representan el 36,8%, son las de mayor interés, ya que demuestran un alto porcentaje (entre 75 y 100%) de biotransformación de la sal sódica del ácido cólico.
- De las 7 cepas mencionadas, tres de ellas: MMAE-17B, MMAE-29A, MMAE-29B, demostraron su capacidad de biotransformar completamente la sal sódica del ácido cólico, hasta la producción de dióxido de carbono (CO₂).
- La cepa MMAE-22C, fue seleccionada para el análisis de sus metabolitos generados durante la biotransformación de la sal biliar, debido que a diferencia de las demás cepas, presentó una mancha grande e intensa a nivel del estándar de referencia del el ácido cólico oxidado en la posición del carbono 3 (C₃), durante la evaluación cromatográfica.
- El metabolito de interés, producido por dicha cepa, identificado mediante resonancia magnética nuclear, indicó que, la reacción más frecuente es la oxidación del grupo hidroxilo de la posición del carbono 3.
- Mediante la coloración de Gram, se obtuvo que, la cepa MMAE – 22C es Gram -.

Recomendaciones

Se propone identificar el nombre científico de cada una de las cepas de Actinomicetos, utilizadas y que biotransformaron, usando métodos como, la caracterización fenotípica y genotípica, debido a que existe dificultad de encontrar un kit específico en el Ecuador, para la identificación de los mismos.

Se sugiere seguir analizando el proceso de biotransformación de las cepas: MMAE-20B, MMAE-1A, MMAE-17A, MMAE-17B, MMAE-17C, MMAE-29A y MMAE-29B, con el fin de obtener metabolitos, diferentes al oxidado en el carbono 3 (C₃).

Sería necesario continuar con esta investigación, para encontrar el producto de la biotransformación, que posea la oxidación en la posición del carbono 7 (C₇), con el fin de llegar a la vía que lleva a la biosíntesis del ácido ursodesoxicólico.

A las cepas, que biotransforman la sal sódica del ácido cólico por completo, hasta la producción de dióxido de carbono (CO₂), se sugiere suministrar mayor cantidad de la sal biliar, debido a que este procedimiento, permitiría observar los metabolitos resultantes de su biotransformación.

Referencias

- Aldabe, S., & Aramendia, P. (2004). *Química 2. Química en acción*. Buenos Aires: COLIHUE.
- Alexandrova, R. I., Kalfin RE, R. E., Leventieva, E. V., Jivkova, T. D., & Dyakova, L. V. (2010). Effect of ursodeoxycholic and deoxycholic acids on viability and proliferation of virus-transformed tumor cells. *Compt Rend Acad Bulge Sci.*, 1837-1844.
- Antelo Queijo, Á. (2010). *Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares*. USC.
- Araujo Guayasamín, M. E., & Ruíz Moreno, A. A. (2014). Aislamiento de microorganismos con la capacidad de biotransformar los ácidos biliares hydodesoxicólico y desoxicólico. *UPS*, 20.
- Atkins, P., & De Paula, J. (2007). *Química Física*. Buenos Aires: Médica Panamericana S. A.
- Barahona Paz y Miño, M. F., & Salas Vernis, G. R. (2013). Plan de manejo ambiental del área pecuaria y procesamiento de alimentos. *Escuela Politécnica del Ejercito*, 3.
- Billmeyer, F. (2004). *Ciencia de los polímeros*. Barcelona: REVERTÉ, S. A.
- Brown, R. L., & Peterson, G. E. (2008). Cholesterol oxidation by soil Actinomycetes. *J Gen Microbiol* 45, 44-450.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Redalyc*, 8.
- Catalán, C. (2007). Uso de enzimas en síntesis orgánica y en procesos industriales. resolución de racematos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromáticas*, 155.
- Cavalier, S. T. (2006). Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 969-1006.
- Chiang, J. Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journald of lipid research*, 1955-1956.

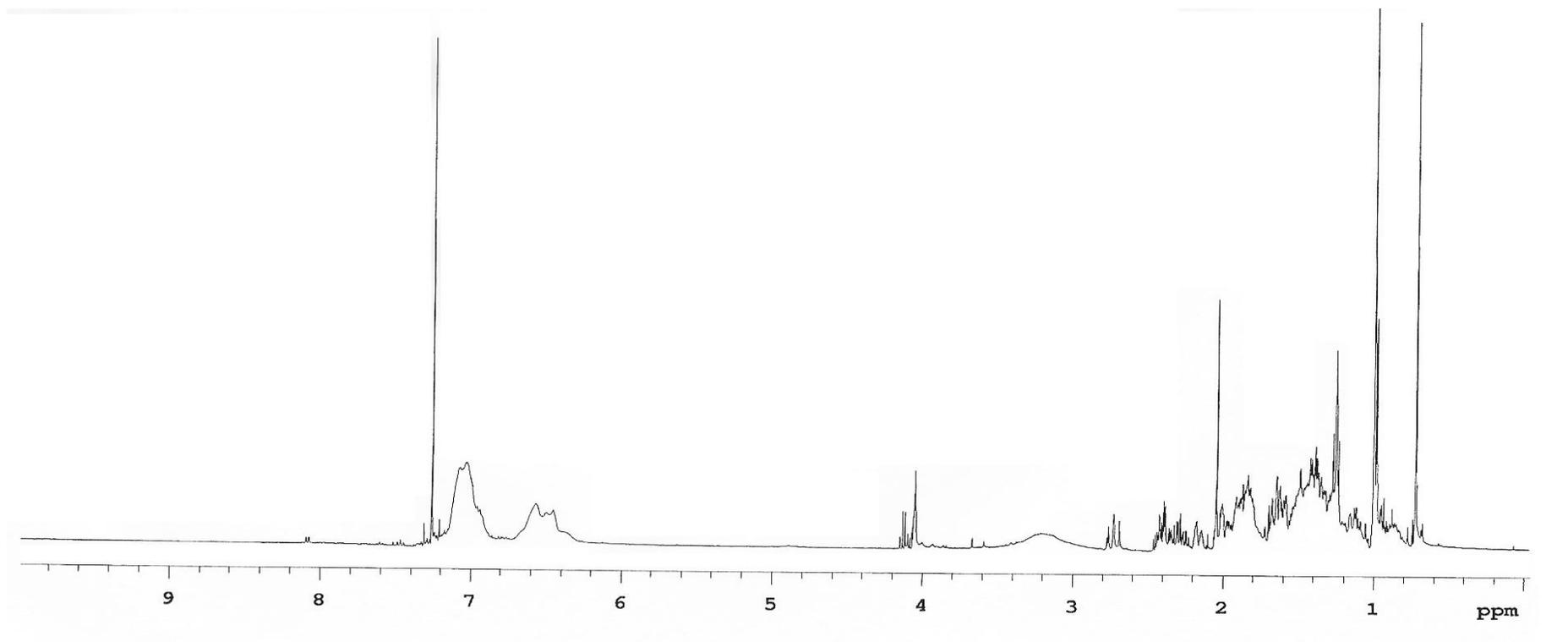
- Daza Vélez, A. F., & Pineda Chavez, J. C. (2014). Evaluación de la capacidad de biotransformación de las sales de ácidos biliares: colato y dehidrocolato de sodio, por microorganismos aislados en dos camales la sierra ecuatoriana. *Universidad Politécnica Salesiana*, 4.
- Degiovanni, V., Martínez, C. P., & Motta, F. O. (2010). *Producción eco-eficiente del arroz en América Latina*. Cali: CIAT.
- Drew H., W. (1995). *Química General, Orgánica y biológica*. México D.F.: Mc.GRAW-WILL.
- EPMRQ. (2013). *EMRAQ-EP*. Obtenido de <http://www.epmrq.gob.ec/index.php/servicios/subproductos>
- FAO. (Marzo de 1992). Obtenido de <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- Ferlini Micheli , H. A., & Díaz., S. (2014). *Biología del Suelo: Un mundo bajo nuestros pies*. Medellín: Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia.
- Fernández, A., & Guasch, L. (2010). Biotransformaciones en la industria. *The industrial enzymologist*, 1-5.
- Franco Correa, M. (2010). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Rev. peru. biol.* , 239-241.
- Frioni, L. (2005). *Procesos Microbianos*. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Giovannini, P. P., Grandini, A., Perrone, D., Pedrini, P., Fantin, G., & Fogagnolo, M. (2008). *ELSEVIER*, 1387-1389.
- Gómez Ruiz, S., Sierra Alonso, M. I., Pérez Quintanilla, D., & Morante Zarcero, S. (2010). *Análisis Instrumental, Volumen 1*. Gesbiblo, S. L.
- Hans , B., & Wolfgang, W. (1987). *Manual de Química Orgánica*. Barcelona: Reverté.
- INEC ESPAC. (2011). Estadísticas Agropecuarias . *Ecuador en cifras*, 10.
- Jenkins, G., & Hardie, L. J. (2008). *Issues in Toxicology, Volume 4 : Bile Acids : Toxicology and Bioactivity*. Carolina: Royal Society of Chemistry.
- Jorrín Novo, J. V., Abril Díaz, M. N., & Bárcena Ruiz , J. A. (2009). Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con

- ninhidrina. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales*, 1-11.
- Kelley, W. N. (1992). *Medicina Interna*. Buenos Aires: Panamericana.
- Kimura, H., Okamura, A., & Kawaide, H. (1993). Oxidation of 3-, 7-, and 12- hydroxyl Groups of Cholic Acid by an Alkalophilic Bacillus sp. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1002-1006.
- Koolman, J., & Heinrich Röhm, K. (2004). *Bioquímica: texto y atlas*. Madrid: Panamericana.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., & Maestri, D. (2008). *Fundamentos teorico-practicos de química organica*. Córdoba: Brujas.
- Maldonado, M. E. (2013). *Biotrasformazioni di Acidi Biliari*. Italia: Tesis Doctoral- Universidad de Ferrara.
- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. México, D. F.: REVERTÉ.
- Martínez Yepes, P. N., & Guarnizo, A. F. (2010). *Experimentos de química orgánica*. Armenia-Colombia: Elizcom.
- Pacheco Guevara, H. A., & Acosta Herrera, J. A. (2014). Tratamiento de desecho para empresas municipales de rastro. *Universidad Central del Ecuador*, 21.
- Pena, A. (2004). *Bioquímica*. México- D. F.: Limusa.
- Primo Yúfera, E. (2005). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Barcelona: REVERTÉ.
- Reinoso Chisaguano, I. C. (2015). Evaluación Ambiental del Río Machángara. *Escuela Politécnica Nacional*, 14.
- Repetto Jimenez, M., & Repetto Kuhn, G. (2010). *Toxicología Fundamental*. Diaz de Santos.
- Requena , A., & Zuñiga, J. (2004). *Espectroscopia*. Pearson Education S. L.
- Roig, P. M. (2007). Biotransformaciones. *Centro de Investigación CEPSA*, 79-89.

- Salazar Loaiza, A. M., & Ordóñez Guerrero, C. A. (2013). *Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de pereira*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Sernka, T. J., & Jacobson, E. D. (1982). *Fundamentos de fisiología gastrointestinal*. Barcelona: REVERTÉ.
- Serrano, J. A. (2005). *Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos*. Mérida: Venezolana C. A.
- Skoog, D. A., Crouch, S. R., & Holler, F. J. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning Latin America.
- Soriano Bernilla, B. S., & Soriano Bernilla, E. (2010). Degradación de pesticidas por Actinomicetos. *Scientia*, 34-37.
- Sutherland, D. J., Macdonalda, I. A., & Forresta, T. P. (2006). The Enzymic and Chemical Synthesis of Ursodeoxycholic and Chenodeoxycholic Acid from Cholic Acid. *Dalhousie University*, 307-321.
- Teijón Rivero, J. M., & Garrido Pertierra, A. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. Madrid: Tébar.
- Tudela, V. (2010). *El colesterol: lo bueno y lo malo*. México: FCE - Fondo de Cultura Económica.
- Vasudevan, D., Sreekumari, S., & Vaidyanathan, K. (1995). *Texto de bioquímica*. Guadalajara: Cuéllar Ayala.
- Weininger, S. J., & Stermitz, F. R. (1988). *Química Orgánica*. Barcelona: Reverté S. A.
- Wiemuth, D., Sahin, H., Lefèvre, C. M., Wasmuth, H. E., & Gründer, S. (2012). Strong activation of bile acid-sensitive ion channel (BASIC) by ursodeoxycholic acid. *Landes Bioscience*, 38-42.
- Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., y otros. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

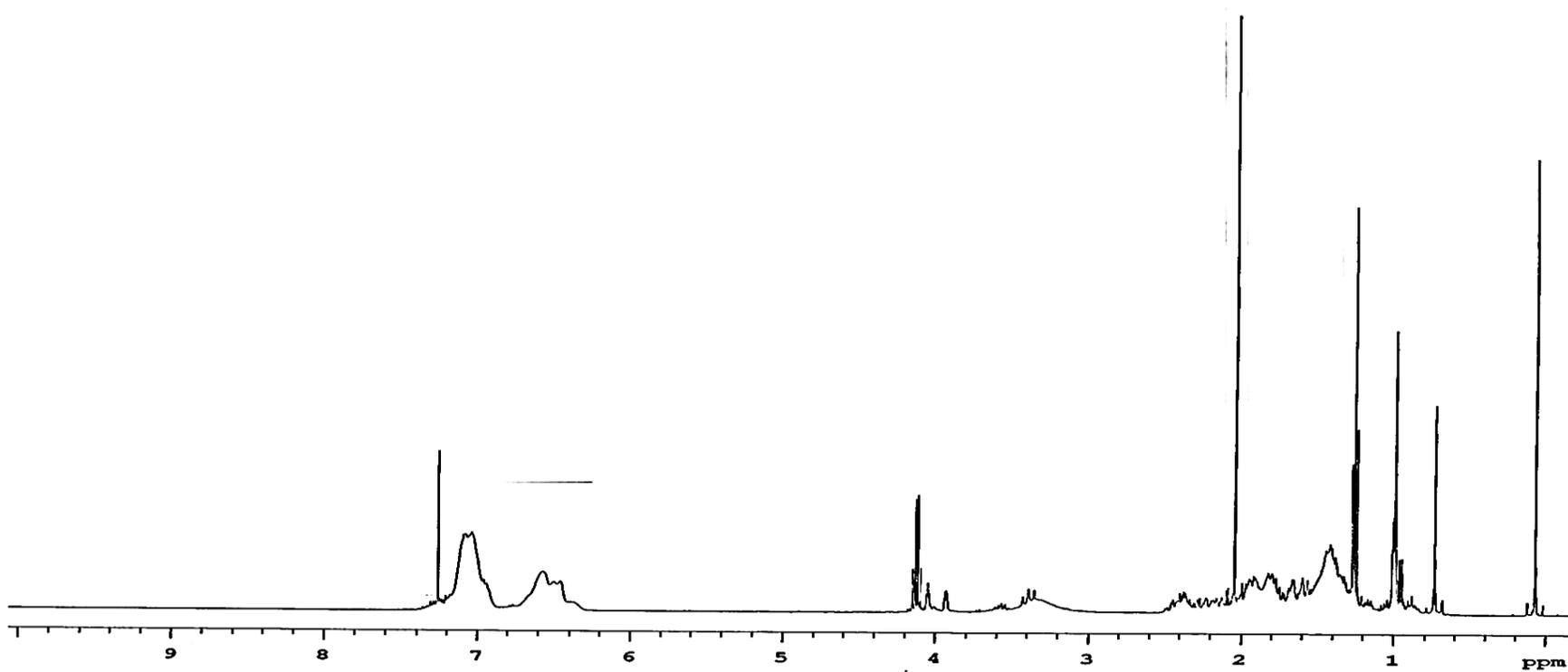
Anexos

Anexo 1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del producto de interés (producto de oxidación en C₃)

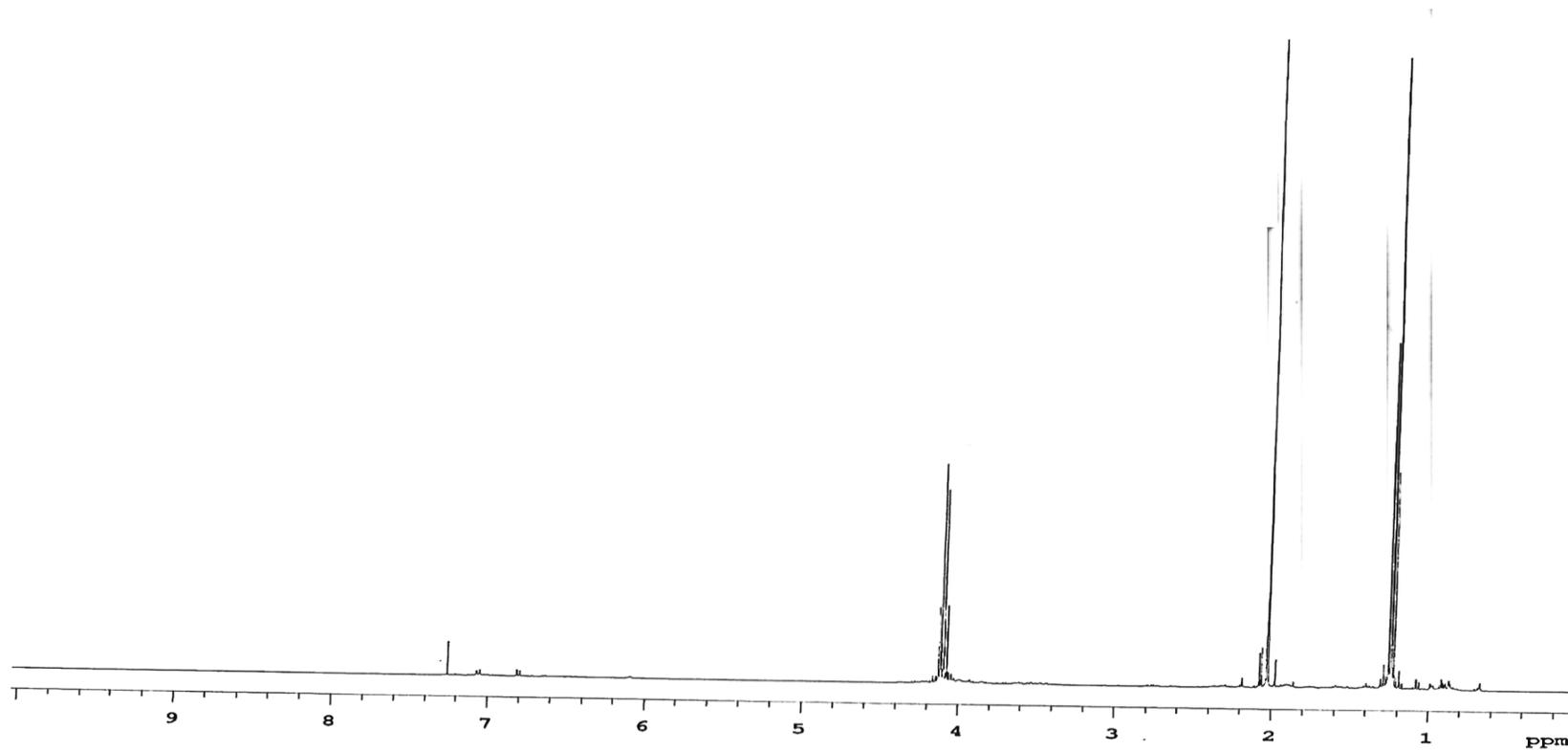


Nota: en el laboratorio de la Universidad Técnica Particular de Loja, se realizaron los espectros cuyas características fueron las siguientes: ¹H-RMN (CD₃OD), los picos seleccionados fueron: δ : 0.80 (s, 3H-18), 1.00 (s, 3H-19), 1.10 (d, J = 6.0 Hz, 3H-21), 3.40 (m, 1H, H-3), 3.85 (m, 1H, H-7), 4.00 (m, 1H, H-12).

Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del ácido cólico.



Anexo 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del producto desconocido.



Anexo 4. Fórmula del medio de cultivo DB DIFCO Columbia Agar Base; cantidad suficiente para 1 litro de preparación.

Triptona	12g
Peptona	5g
Extracto de levadura	3g
Extracto de carne	3g
Almidón	1g
Cloruro de sodio	5g
Agar	13.5g

Nota.: tomado de (Difco™ y BBL™, 2015)

Anexo 5. Formulación del antibiótico ACTINOMYCETE SELECTATAB™

Material	Concentración del medio
Metronidazol	2.5mg/litro
Ácido nalidíxico	25mg/litro

Nota: tonado de (Mast Group, 2015)