

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

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

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

**TEMA:
AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON LA CAPACIDAD DE
BIOTRANSFORMAR LOS ÁCIDOS BILIARES HYODESOXICÓLICO Y
DESOXICÓLICO**

**AUTORAS:
MISHEEL ENITH ARAUJO GUAYASAMÍN
ANDREA ALEJANDRA RUIZ MORENO**

**DIRECTORA:
MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ**

Quito, abril del 2014

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

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

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

Misheel Enith Araujo Guayasamín
CC: 172274401-6

Andrea Alejandra Ruiz Moreno
CC: 1718861956

DEDICATORIA

Yo Andrea Ruiz Moreno, dedico mi trabajo de tesis a mi familia, a Dios, a mis padres y a mi hijo.

Yo Misheel Araujo, dedico mi trabajo de tesis a mi familia y a Dios.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana, a nuestra tutora de tesis María Elena Maldonado, PhD.

A los docentes de nuestra carrera y al laboratorio CIVABI donde desarrollamos el trabajo de tesis.

Misheel Araujo y Andrea Ruiz.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO	3
1.1 Ácidos biliares como componentes de la bilis	3
1.1.2 Composición de la bilis.....	3
1.1.3 Ácidos biliares	4
1.1.4 Ácido desoxicólico	5
1.1.5 Ácido hyodesoxicólico	6
1.2 Biosíntesis de los ácidos biliares	7
1.3 Funciones fisiológicas de los ácidos biliares.....	11
1.4 Descripción del colesterol	12
1.5 Relación, estructura y actividad de los ácidos biliares.....	13
1.5.1 Relación de los ácidos biliares.....	13
1.5.2 Estructura de los ácidos biliares.....	15
1.5.3 Actividad de los ácidos biliares	15
1.6 Alteraciones de las funciones biliares	16
1.7 Patologías asociadas a los ácidos biliares.....	18
1.8 Características farmacológicas	19
1.8.1 Síntesis química de los ácidos biliares de interés farmacéutico	20
1.9 Biotransformación	21
1.9.1 Hidroxilación	21

1.9.2. Δ 1-deshidrogenación	22
1.9.3. Epimerización	22
1.10 Técnicas metodológicas.....	23
1.10.1. Descripción de medios de cultivo.....	23
1.10.2. Análisis de cromatografía en capa fina (TLC).....	24
1.10.3. Identificación del género de los microorganismos	24
1.10.4. Resonancia magnética nuclear.....	26
1.11 Determinación de zonas de muestreo.....	28
CAPÍTULO II	29
MARCO METODOLÓGICO	29
2.1 Materiales y métodos.....	29
2.1.1 Recolección y asilamiento de microorganismos.....	29
2.1.2 Descripción de la zona del matadero del camal de Latacunga	29
2.1.3 Descripción de la zona del matadero del camal de Cayambe.....	30
2.2 Listado de cepas y mantenimiento	30
2.2.1 Procedimiento de aislamiento de bacterias	30
2.2.2 Procedimiento de aislamiento de hongos.....	34
2.3 Preparación de caldos de cultivo	36
2.3.1 Preparación de caldo de cultivos para bacterias	36
2.3.2 Preparación de caldo de cultivos para hongos	36
2.3.3 Preparación del ácido biliar	36
2.3.4 Preparación de revelador	36
2.3.5 Preparación del estándar para placas cromatográficas	37

2.4 Monitoreo de hongos y bacterias.....	37
2.4.1 Procedimiento general para bacterias	37
2.4.2 Procedimiento general para hongos.....	38
2.5 Escalamiento de cultivos de bacterias y de hongos.....	39
2.5.1 Bacterias.....	39
2.5.2 Hongos	39
2.6 Extracción de la parte activa metabolizada por las bacterias y hongos.....	40
CAPÍTULO III.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1 Resultados	41
3.1.1. Situación de los camales en el Ecuador	41
3.1.2. Camal Municipal de Ambato	41
3.1.3. Camal Municipal de Riobamba	42
3.1.4. Camal Municipal de Pedernales	43
3.1.5. Camal Municipal de Guayaquil	44
3.1.6. Camal Municipal de Latacunga	45
3.1.7. Camal Municipal de Antonio Ante	46
3.1.8. Camal Municipal de Cayambe.....	47
3.1.9. Camal Metropolitano de Quito	48
3.2. Tablas de resultados.....	52
3.2.1. Biotransformación de bacterias	55
3.2.3. Biotransformación de hongos	56
3.2.4. Porcentaje de biotransformación del ácido hyodesoxicólico.....	57

3.2.5. Porcentaje de biotransformación del ácido desoxicólico.....	58
3.2.6. Escalamiento de microorganismos	59
3.3 Análisis del potencial de biotransformación	61
3.4 Identificación de las bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico	64
3.4.1 Características de las bacterias identificadas	64
3.5 Identificación de las bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido desoxicólico	65
3.5.1 Características de las bacterias identificadas	66
3.6 Resultados de bacterias más eficientes muestreadas en canales	67
3.6.1. Zonas de muestreo con bacterias más eficientes de biotransformación del ácido hyodesoxicólico	67
3.6.2. Zonas de muestreo con bacterias más eficientes de biotransformación del ácido desoxicólico	68
3.7 Resonancia magnética nuclear	68
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	72
LISTA DE REFERENCIAS	74
ANEXOS	77

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. TLC Bacteria MM B38, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.....	77
Anexo 2. TLC Bacteria MM B26, Lectura a las 24 y 48 horas ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.....	77
Anexo 3. TLC Bacteria MM B 35, Lectura a las 24 y 48 horas ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.....	78
Anexo 4. TLC Hongo MM F12, este no presento biotransformación en primeros 5 días. Presenta biotransformación a 7 días. ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.	78
Anexo 5. TLC Hongo MM F15, este no presento biotransformación en las primeras 5 días. Presenta biotransformación a los 7 días. ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo.....	79
Anexo 6. TLC Bacteria MM B66, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.....	79
Anexo 7. TLC Bacteria MM B67, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.....	80
Anexo 8. TLC Bacteria MM B26, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.....	80
Anexo 9. TLC Bacteria EB MM 42, Lectura a las 24 y 72 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.....	80
Anexo 10. Biotransformación 24 y 48 horas, bacteria MM B25, MM B26. ácido hyodesoxicólico, fase móvil 1.....	81
Anexo 11. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B29 y MM B30. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 1.....	81

Anexo 12. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B35 y MM B36. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 1.....	81
Anexo 13. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B37, MM B38, MM B39 y MM B40. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 1.	82
Anexo 14. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B41, MM B42, MM B43 y MM B44. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.	82
Anexo 15. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B45 y MM B48, Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.....	82
Anexo 16. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B50. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.....	83
Anexo 17. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B54, MM B55 y MM B57. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.	83
Anexo 18. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B58, MM B59 y MM B60. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.	83
Anexo 19. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B62, MM B63, MM B64 y MM B65. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.	84
Anexo 20. Biotransformación 24 horas, bacterias MM B66, MM B67 y MM B68. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.....	84
Anexo 21. Biotransformación 48 horas, hongos MM F12. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.....	84
Anexo 22. Biotransformación 144 horas, hongos MM F15. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.....	85
Anexo 23. Biotransformación 24 y 48 horas, bacteria MM B26. Ácido desoxicólico, fase móvil 1.....	85
Anexo 24. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B30, MM B31 y MM B33. Ácido desoxicólico, fase móvil 1.	85

Anexo 25. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B36. Ácido desoxicólico, fase móvil 1.....	86
Anexo 26. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B42 y MM B44. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.....	86
Anexo 27. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B45, MM B46 y MM B48. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.	86
Anexo 29. Biotransformación 24 horas, bacterias MM B54, MM B55, MM B56 y MM B57. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.	87
Anexo 31. Biotransformación 24 horas, bacterias MM B6, MM B67, MM B68, MM B69. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.	88
Anexo 32. Pruebas de tinción gram (Ácido desoxicólico)	88
Anexo 33. Identificación con pruebas API, Bacteria MM B36 (Ácido hydesoxicólico)	89
Anexo 34. Identificación con pruebas API, Bacteria MM B39.....	90
Anexo 35. identificación con pruebas API, Bacteria MM B66.....	91
Anexo 36. Identificación con pruebas API, Bacteria MM B26 (Ácido desoxicólico)	91
Anexo 37. MM B26: Ácido desoxicólico.....	92
Anexo 38. MM B26: Ácido desoxicólico.....	93
Anexo 39. MM B35: Ácido desoxicólico.....	94
Anexo 40. MM B35: Ácido hydesoxicólico	95
Anexo 41. MM B26: Ácido hydesoxicólico	96
Anexo 42. Esquema del Camal Metropolitano de Latacunga.....	97
Anexo 43. Esquema del Camal Metropolitano de Cayambe	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Estructura del ácido cólico.....	4
Figura N°2. Estructura del ácido quenodesoxicólico.....	4
Figura N°3. Estructura del ciclopentanoperidrofenantrenico.....	5
Figura N°4. Estructura del ácido desoxicólico.....	6
Figura N°5. Estructura del ácido hyodesoxicólico.....	7
Figura N°6. Síntesis hepática.....	8
Figura N°7. Síntesis del colesterol.....	9
Figura N°8. Estructura del ácido desoxicólico.....	10
Figura N°9. Estructura del ácido litocólico.....	10
Figura N°10. Estructura del ácido ursodesoxicólico.....	11
Figura N°11. Transformaciones primarias de los ácidos biliares.....	11
Figura N°12. Transformaciones secundarias de los ácidos biliares.....	12
Figura N°13. Transformaciones terciarias de los ácidos biliares.....	12
Figura N°14. Cromatografía en capa fina (TCL).....	24
Figura N°15. Orientación de los espines nucleares.....	27
Figura N°16. Porcentaje de capacidad de biotransformación del ácido biliar hyodesoxicólico de las bacterias aisladas.....	61
Figura N°17. Porcentaje de capacidad de biotransformación del ácido biliar hyodesoxicólico de los hongos aislados.....	62
Figura N°18. Porcentaje de capacidad de biotransformación del ácido biliar desoxicólico de las bacterias aisladas.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la bilis.....	3
Tabla 2. Bacterias aisladas en el camal de Latacunga.....	31
Tabla 3. Bacterias aisladas en el camal de Cayambe.....	32
Tabla 4 Hongos aislados en el camal de Latacunga.....	34
Tabla 5. Hongos aislados en el camal de Cayambe.....	35
Tabla 6. Detección de bacterias biotransformadoras.....	52
Tabla 7. Detección de hongos biotransformadores.....	54
Tabla 8. Resultado de biotransformación de bacterias (Ácido hyodesoxicólico y desoxicólico).....	55
Tabla 9. Resultado de biotransformación de bacterias (Ácido hyodesoxicólico)	56
Tabla 10. Resultado de biotransformación de bacterias (Ácido desoxicólico)....	56
Tabla 11. Porcentaje de biotransformación de bacterias según TLC (Ácido hyodesoxicólico).....	57
Tabla 12. Porcentaje de biotransformación de hongos según TLC (Ácido hyodesoxicólico).....	58
Tabla 13. Porcentaje de biotransformación de bacterias según TLC (Ácido desoxicólico).....	58
Tabla 14. Número de cepas de bacterias aisladas con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico.....	62
Tabla 15. Número de cepas de hongos aislados con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico.....	62
Tabla 16. Número de cepas de bacterias aisladas con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido desoxicólico.....	63

Tabla 17. Bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico.....	64
--	----

Tabla 18. Bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido desoxicólico.....	65
---	----

RESUMEN

Esta investigación buscó encontrar microorganismos capaces de biotransformar estructuras esteroideas para los ácidos: hyodesoxicólico y desoxicólico que son productos de la síntesis del ácido ursodesoxicólico. Una de las mayores problemáticas que presenta la síntesis del ácido ursodesoxicólico, a nivel industrial son los contaminantes que genera, de tal manera que para producirlo se realizan procesos de síntesis química que producen contaminación ambiental. La síntesis química del ácido ursodesoxicólico fue desarrollada durante los años 50 por Hofman y Fieser, quienes inventaron una metodología con un proceso que consta de 5 pasos (esterificación, acetilación, oxidación, hidrolisis y reducción) para la obtención del ácido quenodexoxicólico y a partir de este, con un proceso que consta de 4 pasos (esterificación, acetilación, oxidación y reducción), obtuvieron el ácido ursodesoxicólico. El interés en el ácido ursodesoxicólico se presenta por su utilización en el campo farmacéutico, para el tratamiento de los cálculos biliares arenosos. Mediante esta investigación se buscó reducir los pasos de síntesis del ácido ursodesoxicólico; disminuyendo el impacto ambiental, encontrando microorganismos con una alta capacidad de biotransformación. Cabe recalcar que esta investigación detectó microorganismos (hongos y bacterias) con capacidad de biotransformar los ácidos: hyodesoxicólico y desoxicólico; mas no se encontró alguna ruta metabólica que ayude a reducir la síntesis del ácido ursodesoxicólico. La búsqueda de microorganismo con capacidad de biotransformar estos ácidos se llevó a cabo, con cromatografía en capa fina; esta técnica permitió visualizar la capacidad de biotransformación de los microorganismos mediante las placas de TLC (thin layer chromatography). Al identificar las bacterias con capacidad de biotransformación se realizaron pruebas de tinción Gram para identificar su morfología; pudiendo constatar que las bacterias Gram Negativas son las que presentan alta eficiencia de biotransformación. Para finalizar se realizó la identificación del género de las bacterias de interés mediante pruebas API, que nos permitieron identificar las siguientes bacterias. Para el ácido Hyodesoxicólico: *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y para el ácido Desoxicólico: *Pasteurella multocida*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus penneri*. **Palabras clave:** Biotransformación, Ácidos biliares, Ácido hyodesoxicólico, Ácido desoxicólico, Sales biliares.

ABSTRACT

This research will seek to find microorganisms capable of biotransform steroid structures for acids and deoxycholic hyodeoxycholic are products Ursodeoxycholic acid synthesis. One major problem presented by the synthesis of ursodeoxycholic acid are industrially pollutants generated, so as to produce chemical synthesis processes which produce environmental pollution are realized. Chemical synthesis of ursodeoxycholic acid was developed in the 50s by Hofman and Fieser, who invented a method with a process that consists of 5 steps (esterification , acetylation , oxidation, hydrolysis and reduction) for obtaining quenodexosicólico acid and from this with a process that consists of 4 steps (esterification , acetylation, oxidation and reduction) obtained ursodeoxycholic acid. Interest in the ursodeoxycholic acid occurs for use in the pharmaceutical field for the treatment of sandy gallstones.

Through this research sought to reduce the steps of synthesis of ursodeoxycholic acid, reducing the environmental impact, finding microorganisms with a high capacity for biotransformation. It should be noted that this research could only detect microorganisms (fungi and bacteria) with the ability to biotransform acids and deoxycholic hyodeoxycholic, but not a metabolic pathway that helps reduce the synthesis of ursodeoxycholic acid was found . Finding biotransform microorganism capable of these acids was carried out, with thin layer chromatography, a technique allowed its biotransformation capacity of the microorganisms by the TLC plates (thin layer cromatograpy). By identifying bacteria capable of biotransformation Gram staining tests were performed to identify the morphology, being able to observe that Gram negative bacteria are those which exhibit high efficiency of biotransformation. To complete the identification of the genus of the bacteria of interest was performed using API testing, which allowed us to identify the following bacteria. For hyodeoxycholic acid: *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* for deoxycholic acid: *Pasteurella multocida*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus penneri*.

Keywords: Biotransformation, Bile Acids, hyodeoxycholic Acid, deoxycholic Acid, Bile salts.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han realizado varias investigaciones sobre la capacidad farmacológica del ácido ursodesoxicólico, siendo el principal tema de interés la capacidad de disolver cálculos biliares arenosos. El ácido ursodesoxicólico, es un ácido biliar natural presente en pequeñas cantidades en la bilis humana, disminuye la secreción del colesterol por el hígado e inhibe la absorción intestinal. (Martindale, 2003)

El ácido ursodesoxicólico (AUDC), es un ácido biliar que se encuentra de forma natural en la bilis de los osos, en la medicina tradicional asiática ha sido utilizado para tratar padecimientos hepáticos y como hepatoprotector; sin embargo, estas especies animales han sufrido las consecuencias, cuando el hombre en su interés por conseguir una adecuada salud extrae la bilis de los osos por su efecto terapéutico. El AUDC se ha utilizado recientemente para el tratamiento de distintas hepatopatías, pero anteriormente resultaba muy difícil obtener grandes cantidades de este producto ya que los animales de donde sacaban el ácido lo producían en pequeñas cantidades. Se vieron en la necesidad de producirlo sintéticamente para mejorar tanto su producción como el efecto terapéutico en las personas. Actualmente para producirlo a gran escala se realizan varios procesos químicos que ocasionan contaminación ambiental por el uso de reactivos (Cromo, Hidróxido de Sodio, entre otros); y que generan grandes cantidades de otros ácidos biliares, como: hyodesoxicólico y desoxicólico, por lo que se busca encontrar, a través de procesos de biotransformación, microorganismos capaces de disminuir los pasos en el proceso de síntesis del ácido ursodesoxicólico y evitar la generación de contaminantes. A su vez buscar microorganismos (capaces de producir oxidaciones y sobre todo reducciones) en los productos finales de síntesis. Mediante cromatografía en capa fina buscamos identificar los productos obtenidos como resultado de la biotransformación, comparándolos con estándares de las oxidaciones en las posiciones 3 y 7 de los ácidos biliares de estudio, capaces de biotransformar las sales biliares a productos de interés presentando cambios en las estructuras moleculares de los compuestos.

Objetivos

General:

- Evaluar microorganismos con la capacidad de biotransformar los ácidos biliares hyodesoxicólico y desoxicólico con posible aplicación en el proceso de la síntesis del ácido ursodesoxicólico.

Específicos:

- Aislar microorganismos con posible capacidad de biotransformar estructuras esteroides.
- Evaluar los microorganismos que tengan la capacidad de biotransformar los ácidos hyodesoxicólico y desoxicólico.
- Identificar los productos con mejor capacidad de biotransformación por medio de cromatografía en capa fina y la evaluación con Resonancia Magnética Nuclear para identificar cambios en las estructuras esteroides.
- Identificar microorganismos de interés mediante la colaboración de Gram y Test de Pruebas Bioquímicas

Hipótesis

Hipótesis Alternativa

- Los microorganismos aislados de los camales de Latacunga y Cayambe, tienen la capacidad de biotransformar los ácidos biliares (hyodesoxicólico y desoxicólico) en metabolitos de interés.

Hipótesis Nula

- Los microorganismos aislados de los camales de Latacunga y Cayambe, no tienen la capacidad de biotransformar los ácidos biliares (hyodesoxicólico y desoxicólico) en metabolitos de interés.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Ácidos biliares como componentes de la bilis

En los seres humanos la vesícula biliar tiene forma de bolsa y se coloca por debajo del borde anterior del lóbulo derecho del hígado, su función es, precisamente, acumular y concentrar la bilis. Como resultado de la contracción de la pared muscular de la vesícula biliar, la bilis se excreta en la vía biliar. (Ahmad, Garg, & Johri, 1992)

La bilis es una solución electrolítica a pH 6.8-8.0 producida por las células del hígado y las células de los canaliculos biliares en una cantidad diaria de entre 500 a 1500 mililitros. Sintetizada por el hígado, la bilis se secreta en los pequeños conductos biliares donde, a través del conducto hepático común y el conducto cístico, se almacena en la vesícula biliar. (Ahmad, Garg, & Johri, 1992)

1.1.2 Composición de la bilis

Tabla N°1. Composición de la bilis

Agua	82%
Acido biliar	12%
Fosfolipidos	4%
Colesterol no esterificado	0.7%
Componentes menores	1.3%

Fuente: (Ahmad, Garg, & Johri, 1992)

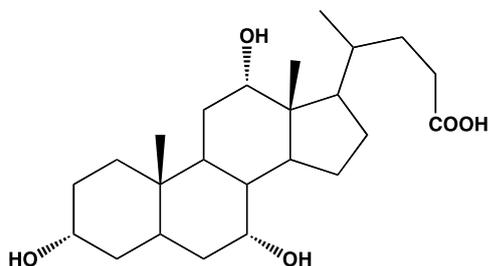
Los componentes más importantes de la bilis son los ácidos biliares (ácido cólico y ácido quenodesoxicólico). Ellos son producidos por los hepatocitos a partir del colesterol y posteriormente, se conjugan a dos aminoácidos: glicina y taurina. (Baldassare, Bertoni, Chiappe, & Marioni, 2000)

1.1.3 Ácidos biliares

Los ácidos biliares son compuestos de 24 átomos de carbono dihidroxilados o trihidroxilados, que derivan del colesterol. Por lo tanto son esteroides, una clase de lípidos insaponificables. Además, estos ácidos, son derivados estructurales del ácido cólico, que se caracteriza por tener en el C17 una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono, destacando:

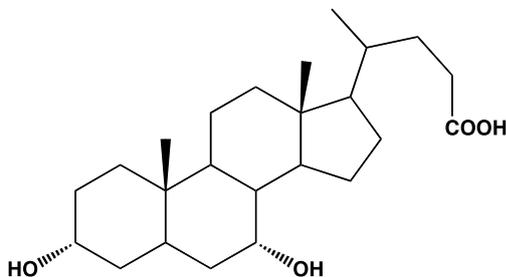
- El ácido cólico (hidroxilado en posición 3-7 y 12 α).
- El ácido litocólico (hidroxilado en posición 3 α y 24 α).
- El ácido desoxicólico (hidroxilado en posición 3 α y 12 α).
- El ácido ursodesoxicólico (hidroxilado en posición 3-7 y 24 α).
- El ácido 3- α 7- β -hidroxicolánico.
- El ácido hyodesoxicólico

Figura N° 1: Estructura del ácido cólico



Fuente: (Maldonado, 2013)

Figura N° 2: Estructura del ácido quenodesoxicólico



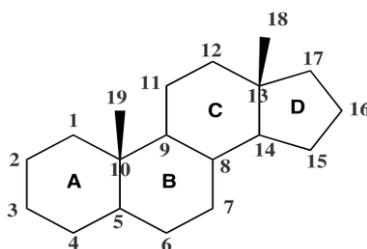
Fuente: (Maldonado, 2013).

Los ácidos antes mencionados componen la bilis, los cuales forman sales que actúan como detergentes en el intestino delgado disminuyendo la tensión superficial de las

grasas que provocando la emulsión de las mismas, que se degradarán posteriormente por la acción de las lipasas. Son necesarios para la absorción de las vitaminas liposolubles. Tienen una acción catártica suave, mejoran el drenaje biliar y evitan la presencia de infecciones. Con gran frecuencia aparecen conjugados a los aminoácidos glicina y taurina. Así, el ácido cólico formará los ácidos taurocólico y glicocólico. (Roda, Roda, & Hofman, 1999)

La estructura básica de los esteroides es el anillo ciclopentanoperidrofenantrenico, por esta razón, la molécula se define anfipática, es decir que contienen regiones polares y apolares de las misma estructura molecular, y en virtud de esta propiedad físico-química actúan como detergentes muy efectivos. (Roda, Roda, & Hofman, 1999)

Firura N° 3: Estructura del ciclopentanoperidrofenantrenico



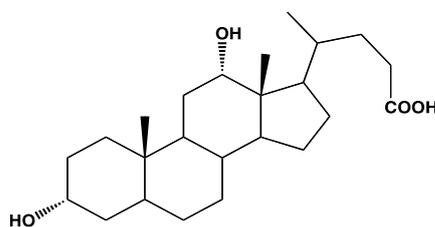
Fuente: (Maldonado, 2013)

Al igual que el colesterol, las sales biliares se sintetizan en el hígado, y se depositan (acumulan y concentran) en la vesícula biliar, desde donde se segregan al intestino delgado, para el procesamiento de la fracción grasa de los alimentos. Los ácidos biliares son el constituyente fundamental de la bilis, solubilizando los lípidos de la dieta para que puedan ser absorbidos. (López, José, 2013)

1.1.4 Ácido desoxicólico

El ácido desoxicólico es un ácido biliar. Cuando es puro se presenta en forma de polvo cristalino de color blanco o casi blanco, con el punto de fusión en 174-176°C. El ácido desoxicólico es uno de los cuatro principales ácidos producidos por el hígado. (López, José, 2013)

Figura N° 4: Estructura del ácido desoxicólico



Fuente: (Maldonado, 2013)

El desoxicolato de sodio es la sal sódica del ácido desoxicólico, soluble en agua y al igual que otras sales biliares inhibe microorganismos Gram positivos, así como también organismos formadores de esporas por lo que se utiliza en medios selectivos para enterobacterias. (King, M, 2013)

1.1.4.1 Aplicaciones

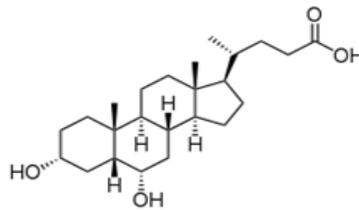
En el cuerpo humano el ácido desoxicólico se utiliza en la emulsificación de las grasas para su posterior absorción en el intestino, se emplea como agente coadyuvante para solubilizar medicamentos de uso intravenoso y parenteral, también usado como reforzador de absorción permitiendo una mayor disponibilidad del fármaco. Fuera del cuerpo se usa en experimentos de base como colagogo (son fármacos o extractos de plantas que facilitan la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar, y casi siempre van acompañados de acción purgante intestinal). Tiene efecto sobre las proteínas de las membranas celulares, comportándose como un detergente aniónico en concentraciones relativamente bajas. Igualmente es usado frecuentemente en inyecciones de mesoterapia; actúa estimulando el metabolismo celular, mejora el aporte de nutrientes a los tejidos, causa dilatación de los vasos sanguíneos, tiene una acción de anti radicales libres y estimula al sistema inmune. (Roda, Roda, & Hofman, 1999)

1.1.5 Ácido hyodesoxicólico

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, uno de los subproductos metabólicos de las bacterias intestinales. Se diferencia de ácido desoxicólico en que

el 6 α - hidroxilo está en la posición del carbono 12 en lugar del primer carbono. El grupo 6 α - hidroxilo hace HDCA sea un ácido hidrófilo, una propiedad que comparte con el ácido hycólico. 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)

Figura N° 5: Estructura del Ácido Hyodesoxicólico



Fuente: (Maldonado, 2013)

1.2 Biosíntesis de los ácidos Biliares

Los productos finales de la utilización de colesterol son los ácidos biliares. Por otra parte la síntesis de ácidos biliares es la ruta principal del catabolismo del colesterol en los mamíferos, mecanismo de excreción del exceso de colesterol, aunque está excreción es insuficiente para compensar el exceso de colesterol debido a la dieta en algunos casos, cabe recalcar que el hígado es el único órgano en el que se produce la biosíntesis. (Maldonado, 2013)

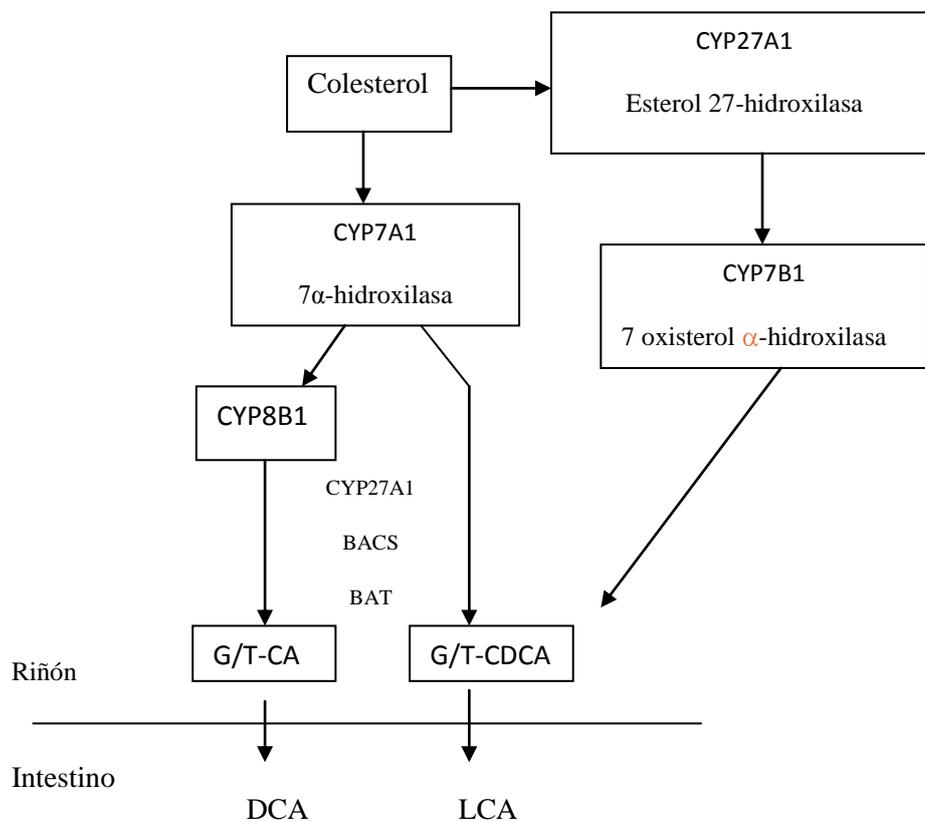
Se requiere de 17 enzimas individuales para la síntesis y se produce en múltiples compartimentos celulares, incluyendo: el citosol, el retículo endoplasmático (ER), las mitocondrias y en el peroxisoma. Los genes codificadores para las distintas enzimas implicadas en la síntesis de ácidos biliares son estrictamente regulados para asegurar que el nivel necesario de la producción de ácidos biliares esté en línea con el cambio de condiciones metabólicas. (Maldonado, 2013)

El primer paso en la síntesis hepática de estas moléculas de esteroides es el 7 α -hidroxilación de colesterol catalizada por la enzima 7 α -hidroxilasa (CYP7A1)

ubicada en el retículo endoplasmático. La actividad de esta enzima está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa donde los ácidos biliares pasan desde el intestino hacia el hígado a través del sistema portal. (Maldonado, 2013)

La vía metabólica iniciado por CYP7A1 es considerada como la vía "clásica" o "neutra" en la síntesis de ácidos biliares. Hay una ruta alternativa que involucra la hidroxilación de colesterol en el carbono 27 (C-27) a través de la enzima mitocondrial esterol 27-hidroxilasa (CYP27A1). Esta alternativa se denomina: vía "amarga" de la síntesis. (Maldonado, 2013)

Figura N°6: Síntesis Hepática

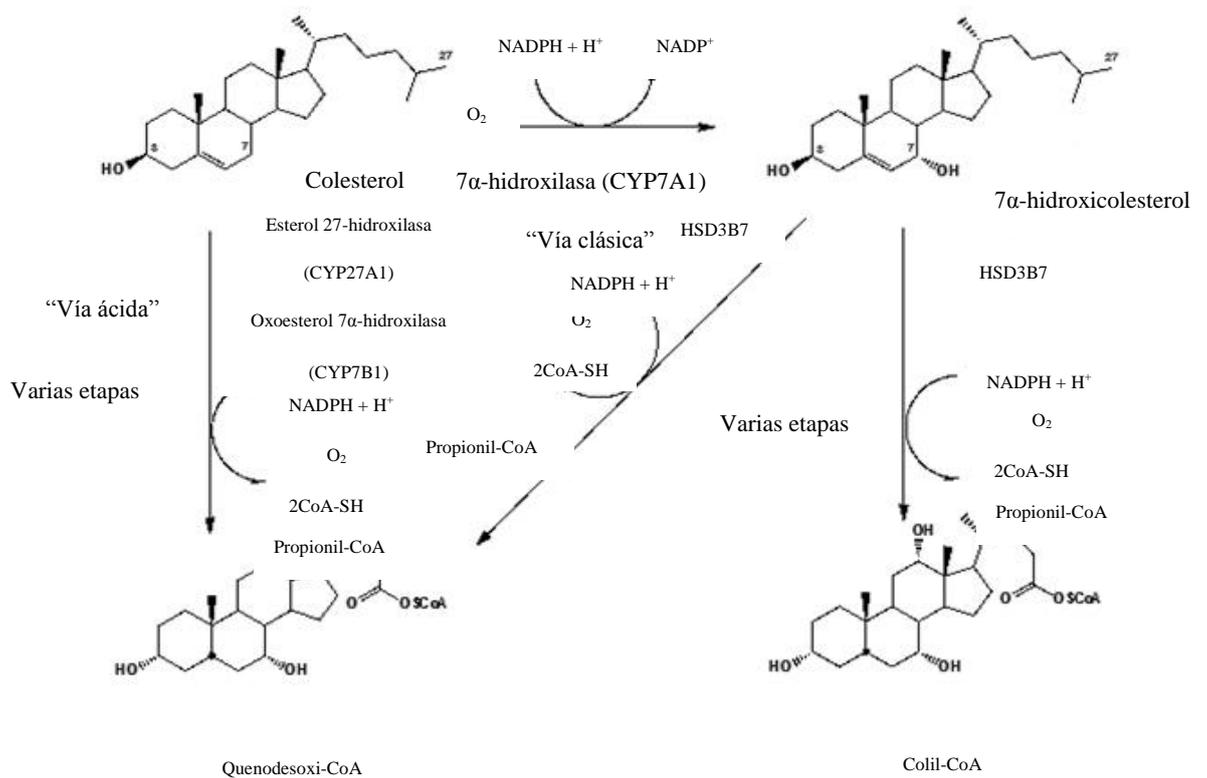


Modificado de: (Maldonado, 2013)

Los ácidos biliares son productos intermedios de CYP27A1 que posteriormente son hidroxilados en la posición C-7 de 7 oxisterol α -hidroxilasa (CYP7B1). Aunque esta vía no es la ruta principal en los seres humanos para la síntesis de ácidos biliares, es importante señalar que en los bebés se puede presentar una mutación en el gen CYP7B1. Este niño presentará una colestasis grave (obstrucción en el flujo de la bilis desde el hígado) con cirrosis y disfunción; esta es la reacción crítica en la síntesis de ácidos biliares que se demuestra en los niños que tienen una mutación en el gen que

codifica la HSD3B7. Estos niños desarrollan enfermedad hepática progresiva que se caracteriza por ictericia. Después de la acción de HSD3B7 se procede a lo largo de dos rutas metabólicas que conducen como productos finales ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido cólico (CA). (Maldonado, 2013)

Figura N°7: Síntesis del colesterol



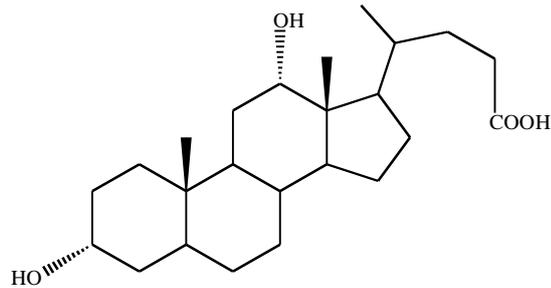
Modificado de: (Maldonado, 2013)

En cuanto al colesterol, se realiza un acortamiento de la cadena lateral, la inversión de la estereoquímica de los anillos A y B, y finalmente la reducción del doble enlace en el anillo B. (Baldassare, Bertoni, Chiappe, & Marioni, 2000)

Los ácidos biliares primarios, el ácido cólico y ácido quenodesoxicólico producidos en el hígado, se excretan en la bilis principalmente en la forma de sales de sodio y conjugados con los aminoácidos taurina y glicina; posteriormente pasan al duodeno a través de los conductos biliares. En esta zona del intestino delgado se expresa la principal acción fisiológica de los ácidos biliares o la capacidad de permitir la

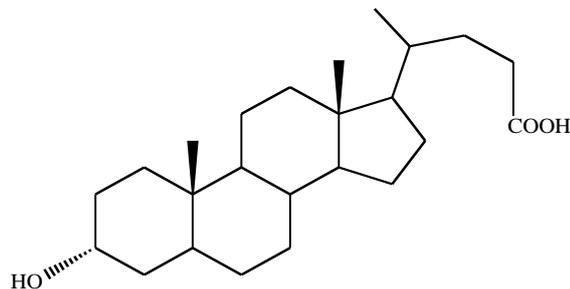
digestión y absorción de los lípidos. En el lumen intestinal una parte de los ácidos biliares primarios aproximadamente de un 10-15%; son desdoblados y digeridos por la flora bacteriana que se encuentra en el intestino. Estas reacciones conducen a la formación de ácidos biliares secundarios: ácido desoxicólico y litocólico. (Baldassare, Bertoni, Chiappe, & Marioni, 2000)

Figura N°8: Estructura del ácido desoxicólico



Fuente: (Maldonado, 2013).

Figura N°9: Estructura del ácido litocólico



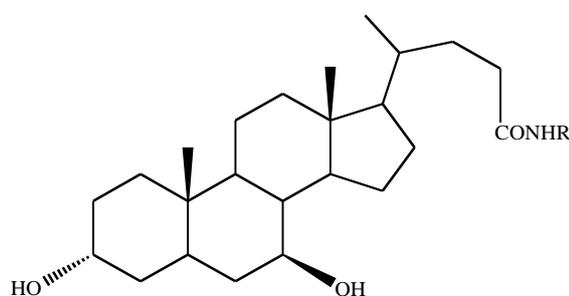
Fuente: (Maldonado, 2013).

Estos son absorbidos en el nivel anterior de la porción proximal del yeyuno y el colon por medio de transporte pasivo, mientras que los compuestos y conjugados de mayor número de grupos hidroxilo; se encuentran en lugares que están mediados por los portadores de carga. (King, M, 2013)

Después de ser absorbidos por el intestino, los ácidos biliares son re transmitidos al hígado, donde se someten a diversas transformaciones que generan ácidos biliares terciarios; por ejemplo del ácido litocólico que se conoce hepatotóxico, se sulfata (por lo que es ácido sulfolitocólico) para aumentar la solubilidad en agua y por lo tanto disminuyen su reabsorción. (King, M, 2013)

Los ácidos biliares se transforman conjugándose con taurina (es un ácido orgánico que interviene en la formación de la bilis, que se encuentra naturalmente en pequeñas cantidades en los tejidos de muchos seres vivos y en varios alimentos) y glicina (es un aminoácido que forma las proteínas de los seres vivos) y se excretan en la bilis. En el intestino se producen más reacciones catalizadas por la flora bacteriana tales como la hidrólisis de los conjugados y la epimerización en la posición 7 (a partir de la α sustituyente a pases β). El ácido quenodesoxicólico conduce a la formación de ácido ursodesoxicólico. (Chiang, 2002)

Figura N° 10: Estructura del ácido ursodesoxicólico



Fuente: (Maldonado, 2013).

1.3 Funciones fisiológicas de los ácidos biliares

Las transformaciones más representantes de los ácidos biliares se presentan en el siguiente esquema:

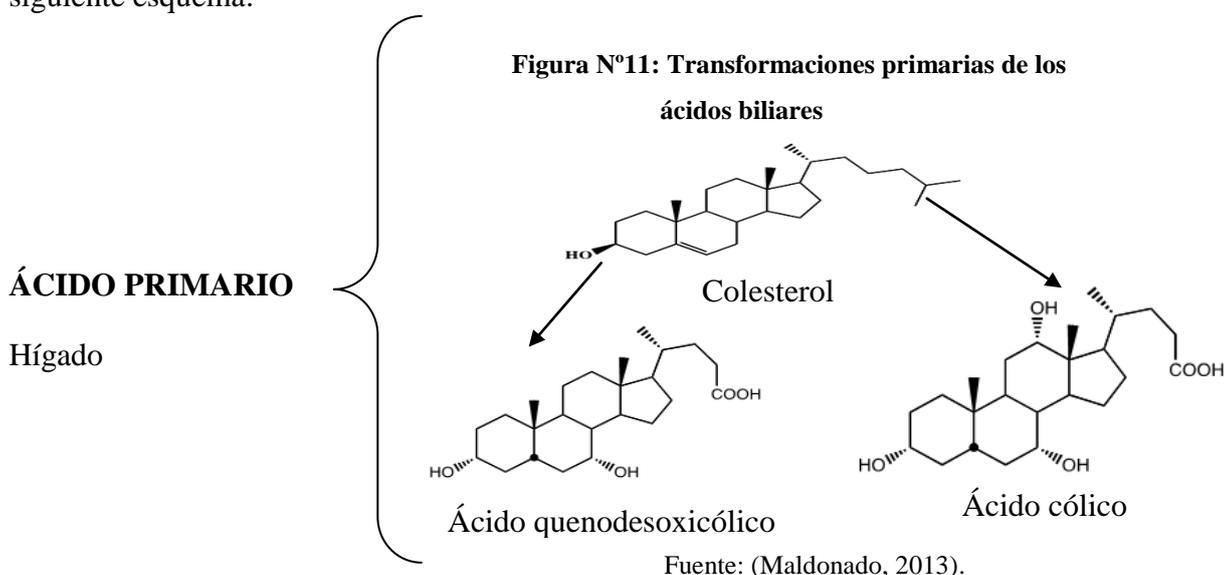
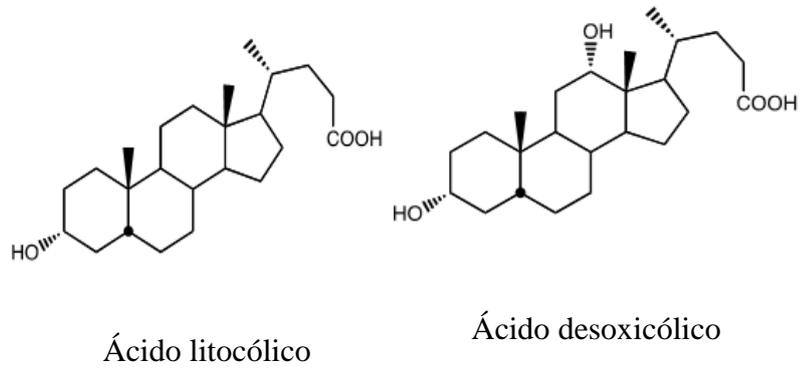


Figura N°12: Transformaciones secundarias de los ácidos biliares

ÁCIDO SECUNDARIO

Bacterias

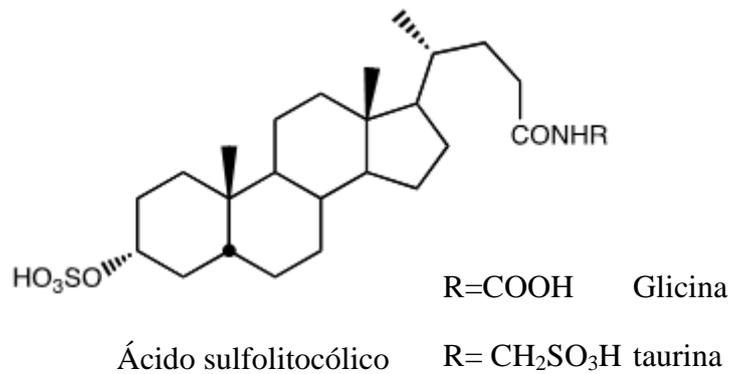


Fuente: (Maldonado, 2013).

Figura N°13: Transformaciones terciarias de los ácidos biliares

ÁCIDO TERCIARIO

Hígado



Fuente: (Maldonado, 2013).

1.4 Descripción del colesterol

El colesterol es un componente fundamental de las membranas celulares. Regula la fluidez de la membrana y es precursor de hormonas esteroideas y de la vitamina D. Se transporta en sangre en forma de lipoproteínas. Los distintos tipos de lipoproteínas y sus niveles en sangre son factores determinantes en la aparición de enfermedades cardiovasculares. El colesterol es un esteroide componente

fundamental de las membranas celulares. También se encuentra almacenado dentro de las células en forma de esteres de colesterol. Sus funciones principales derivan de su papel como componente de las membranas y de su naturaleza esteroidea ya que es precursor de hormonas tales como la testosterona, la aldosterona y la vitamina D. El colesterol proviene de la dieta o, en su mayor parte, de la síntesis endógena en el hígado. La enzima HMG-CoA reductasa cataliza el primer paso de la síntesis de colesterol. (Fibao, 2007)

El colesterol es transportado en la sangre unido a proteínas (apolipoproteínas, que es una heteroproteína anfipática con un grupo prostético lipídico, que se encuentra formando parte de las lipoproteínas), en forma de esteres de colesterol, constituyendo los quilomicrones, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La LDL transporta el colesterol del hígado a los tejidos mientras que la HDL lo transporta de los tejidos al hígado para su excreción con la bilis. (Fibao, 2007)

1.5 Relación, estructura y actividad de los ácidos biliares

1.5.1 Relación de los ácidos biliares

Los productos finales de la utilización del colesterol son los ácidos biliares. En efecto, la síntesis de los ácidos biliares es la principal vía de catabolismo de colesterol en los mamíferos. Aunque varias de las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos biliares se activa en muchos tipos de células, el hígado es el único órgano donde su completa biosíntesis puede ocurrir.

El enfoque de estructura - función no siempre es tan automática y no es suficiente para explicar completamente el metabolismo y la fisiología de los ácidos biliares, ya que hay otros mecanismos que afectan su función como por ejemplo: propiedades reguladoras de las enzimas, los mecanismos de captación hepática del hígado y la actividad intestinal mediada por el portador específico. (Maldonado, 2013)

La relación entre la estructura y función de los ácidos biliares debe tener en cuenta una serie de consideraciones complejas, tales como:

- Los ácidos biliares se sintetizan a partir del colesterol en el hígado inmediatamente conjugado con los aminoácidos glicina y taurina y sólo entonces secretado en la bilis.
- Los ácidos biliares se absorben en el intestino por diferentes mecanismos.
- Los ácidos biliares interactúan con proteínas portadoras de albúmina y otras en el suero y son recogidos en el hígado.

La relación entre la función fisiológica y la estructura pasa a través de la definición de las propiedades físico - químicas más importantes. La biosíntesis hepática de colesterol a ácidos biliares transforma por completo la estructura de este esteroide con la formación de una molécula anfipática que tiene dos zonas diferenciadas, una hidrofílica y el otro ácido biliar lipofílico; y esto le da la propiedad conocida de "detergentes ". (Maldonado, 2013)

Desde el punto de vista químico-físico se define el área de la superficie de la molécula dividido en la zona de "sin carga" y el área con "carga" para el respectivo esqueleto de hidrocarburo lipófilo de la molécula y los grupos OH polares presentes en número diferente, posición y orientación. Y la posibilidad de cuantificar las contribuciones de grupos OH individuales y predecir ciertas propiedades tales como la concentración de masa crítica (CMC) y la lipofilia. El ácido biliar permite la formación de soluciones micelares, a saber, los agregados de muchos monómeros, en el que las partes lipofílicas de la molécula están en contacto entre ellas mediante la eliminación de agua en los reproductores (widgest). Las leyes del equilibrio químico predicen que este fenómeno se produce en un área bien definida de la concentración por debajo del cual hay sólo monómeros, mientras que por encima de la concentración de ácidos biliares en los agregados micelares aumenta mucho más que la de los monómeros. (Maldonado, 2013)

1.5.2 Estructura de los ácidos biliares

Su estructura es la de un ciclopentanofenantreno, también están relacionadas con la vitamina D. Se forman del ácido glicocólico y taurocólico. Estos a su vez se forman del ácido cólico como un aminoácido y la glicina con la taurina. Las células hepáticas vierten los ácidos glico y taurocólico en la bilis en forma de sales sódicas. (Chiang, 2002)

En resumen, los ácidos biliares de las distintas especies difieren químicamente en tres aspectos:

- Estereoquímica de los anillos A/B
- Estructura de la cadena lateral
- Distribución del número, posición y estereoquímica de los grupos hidroxilos en el núcleo esteroide.

La mayoría de los ácidos biliares se encuentran en la naturaleza en forma de sus sales sódicas aunque en algunos casos pueden aparecer conjugados con determinados aminoácidos como la glicina (un 75% de los ácidos biliares conjugados) y con la taurina (un 25%), dando lugar a la formación de las correspondientes amidas. (Chiang, 2002)

1.5.3 Actividad de los ácidos biliares

Los ácidos biliares realizan tres funciones fisiológicas importantes:

- **Regulación de la secreción de la bilis**

La secreción biliar es sintetizada y secretada por el hepatocito a los canalículos biliares, que drenan al conducto hepático común. El estímulo más importante de la secreción de la bilis es el contenido en los vértices o áreas portales. Las sales biliares son absorbidas desde el intestino delgado al final de la digestión intestinal. Su síntesis y subsiguiente excreción en las heces representan el único mecanismo significativo para la eliminación del exceso de colesterol. (Maldonado, 2013)

- **El transporte de la bilis y la emulsión de lípidos (colesterol)**

La bilis tiene la capacidad de eliminar el colesterol que proviene de los alimentos y que es sintetizado por el cuerpo. Los ácidos biliares y los

fosfolípidos solubilizan el colesterol en la bilis previniendo la precipitación del colesterol en la vesícula biliar. (Maldonado, 2013)

- **Digestión y absorción intestinal de los lípidos**

Las sales biliares son sustancias altamente tenso activas que reducen la tensión superficial del agua, facilitan la digestión de triglicéridos dietéticos actuando como agentes emulsificadores que hacen a las grasas accesibles a las lipasas pancreáticas. (Maldonado, 2013)

1.6 Alteraciones de las funciones biliares

Los ácidos biliares son el producto final del metabolismo de los hepatocitos del colesterol de la dieta, son sintetizados por las células del hígado o durante el metabolismo de las grasas. Las células del hígado producen un promedio de un gramo diario de ácidos biliares que son secretadas en la bilis en forma de sales de sodio. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

La bilis, es producida continuamente por las células hepáticas, se secreta por medio de diminutos canalículos; dichos canalículos biliares se encuentran en el medio de las células dobles del hígado, de donde la bilis fluye periféricamente en la dirección de los conductos biliares terminales, conductos que desembocan gradualmente hasta el conducto hepático y el conducto biliar común. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

La cantidad de bilis producida es entre 600 y 800 ml/día, mientras que la capacidad máxima de la vesícula biliar es sólo 40-70 ml. Sin embargo, la secreción biliar de al menos 12 horas se puede almacenar en la vesícula biliar, gracias al hecho de que H₂O, Na⁺, Cl⁻ y otros electrolitos son absorbidos continuamente por la mucosa de la vesícula biliar. Se produce entonces a una concentración de todos los constituyentes de la bilis, incluyendo sales biliares, colesterol y bilirrubina. De esta manera, la bilis puede ser concentrada de 5 a 10 veces. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

Dos condiciones son necesarias para el vaciamiento de la vesícula biliar:

- La relajación del esfínter de Oddi para permitir que el flujo de salida de la bilis desde el conducto biliar común en la dirección del duodeno.
- La contracción de la propia vesícula biliar para forzar el paso de la bilis en el conducto biliar común. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

Las sales biliares ejercen dos funciones importantes en el tracto digestivo:

- **Función Emulsionante:** gracias a sus características químico-físicas, las grasas de los alimentos ejercen una acción detergente, es decir, la reducción de la tensión superficial, hacen que durante la mezcla del bolo en el intestino se fragmenten en pequeñas gotas de grasa.
- **Función hidrotrópica:** consiste en la capacidad que tienen las sales biliares para facilitar la absorción intestinal de ácidos grasos, monoglicéridos, colesterol y otros lípidos.

Se cree que los iones de las sales biliares son adsorbidos físicamente por los lípidos y las cargas eléctricas que presumiblemente aumentan la solubilidad de los lípidos, lo que permite el rápido paso a través de la mucosa intestinal. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

Los trastornos relacionados con una alteración de la función biliar son de dos tipos:

- **La escasez de ácidos biliares:** este déficit en el nivel intestinal puede, en casos graves, provocar una pérdida del 40 % de la grasa ingerida, en cuyo caso, el sujeto sufre deficiencias metabólicas. Por otra parte, en ausencia de una adecuada absorción de grasa, incluso las vitaminas solubles en grasa no son absorbidas de una manera satisfactoria. Cabe señalar en este caso, una escasez de las vitaminas A, D, E, y K. Las vitaminas A, D, y E se depositan en el organismo en grandes cantidades. Este fallo provoca una falta de producción hepática de la protrombina y el factor VII con una alteración del proceso de coagulación de la sangre.
- **Formación de cálculos biliares:** durante el proceso de la secreción de ácidos biliares aproximadamente el 10 % del colesterol se elimina con la bilis. El colesterol presente en la bilis no tiene ninguna función y se cree que representa simplemente un producto intermedio de la biosíntesis de las sales biliares. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

El colesterol es casi insoluble en agua, pero las sales biliares, ácidos grasos y lecitina presente en la bilis ejercen una acción hidrotópica haciendo al colesterol soluble. Como la bilis en la vesícula biliar se está concentrando, todas las sustancias que actúan hidrotópicas se centran junto con el colesterol, por lo que, permanecen en solución. Sin embargo, si el colesterol está presente en altas concentraciones puede precipitar dando lugar a la formación de cálculos biliares. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

Las sales biliares inhiben la colinesterasa, la que hidroliza a la acetilcolina que es la sustancia que permite la transmisión nerviosa producida por el vago, por tanto, aumenta el poder de los nervios parasimpáticos y las contracciones del intestino. Donde hay deficiencia biliar hay, comúnmente, estreñimiento, también actúa como ligero agente bacteriostático, inhibiendo el excesivo crecimiento del colibacilo. Se ha puesto en duda esta acción al observar que los conductos biliares se infectan a pesar de estar lleno de bilis, pero no hay duda que tienen acción antiputrefactiva. (Houten, Watanabe, & Auwerx, 2006)

1.7 Patologías asociadas a los ácidos biliares

Alteraciones metabólicas asociadas a la síntesis de ácidos biliares y el metabolismo se clasifican como trastornos primarios o secundarios. Los trastornos primarios implican deficiencias hereditarias de las enzimas responsables de catalizar reacciones clave en la síntesis de los ácidos cólicos y quenodesoxicólico. Los trastornos clasificados como secundarios se refieren a los defectos metabólicos que afectan a la síntesis de ácidos biliares primarios, debido a defectos en las enzimas responsables de la síntesis. En la tabla siguiente se muestran seis trastornos primarios del metabolismo de los ácidos biliares. (Wolkoff & Cohen, 2003)

El embarazo es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de cálculos de colesterol. El riesgo está relacionado con la frecuencia y el número de embarazos. Las hormonas sexuales inducen una variedad de cambios fisiológicos en el sistema

biliar que acaba secretando bilis muy saturada de colesterol, lo que promueve la formación de cálculos. Es debido fundamentalmente a la inducción de la secreción de colesterol por parte de los estrógenos, exceso de producción de ácidos biliares y un vaciamiento más lento debido a la progesterona. Estos cambios se normalizan en uno o dos meses tras el parto. En el postparto el 61% de casos con barro biliar se resuelven y aproximadamente el 30% de las litiasis menores de 10 mm desaparecen. (Wolkoff & Cohen, 2003)

Señalaremos algunos de los fenotipos afectados y la enzima que producen el trastorno:

- 7α colesterol-hidroxilasa (CYP7A1): Sin disfunción hepática, se manifiesta el fenotipo clínico con el colesterol total muy elevados, así como el LDL.
- Esterol 27-hidroxilasa (CYP27A1): La disfunción neurológica progresiva, colestasis neonatal, las cataratas bilaterales, la diarrea crónica.
- 3β -hidroxi- Δ^5 -C₂₇oxidoreductasa esteroides (HSD3B7): Con mayor frecuencia defecto en la síntesis de ácidos biliares, presentación clínica heterogénea que incluye ictericia progresiva, hepatomegalia, pruritis, malabsorción con esteatorrea resultante (Diarrea grasa), la deficiencia de vitamina soluble en grasa, el raquitismo.
- Δ^4 -3-oxosteroid 5β -reductasa (AKR1C4): Manifestación clínica similar a la deficiencia de HSD3B7 aunque con la presentación anterior los recién nacidos afectados tendrán una severa enfermedad del hígado, con rápida progresión a cirrosis y la muerte si no se lleva a cabo la intervención clínica. (Wolkoff & Cohen, 2003)

1.8 Características farmacológicas

En los años 70 y actualmente en Ecuador, uno de los pocos tratamientos terapéuticos contra los cálculos biliares está representado por medio de la cirugía, sin embargo, hoy en día muchos pacientes son tratados con diferentes tipos de terapias; a base de ácido quenodesoxicólico y el ácido ursodesoxicólico, ya que muchos estudios han demostrado que los cálculos biliares se solubilizan si entran en contacto con estas sustancias.

El ácido ursodesoxicólico, conocido también como: ácido quenodesoxicólico 7β -epímero, representa un pequeño porcentaje del total de ácidos biliares presentes de forma natural en la bilis humana, este es capaz de aumentar en los seres humanos la capacidad de solubilizar el colesterol en la bilis transformándolo de bilis litógena a la bilis no litógena. (Roda, Roda, & Hofman, 1999)

Los mecanismos por los cuales estos efectos farmacológicos ocurren son más de uno, como:

- Disminución de la secreción de colesterol en la bilis, debido a la reducción de la síntesis de colesterol hepática y su absorción en el intestino
- Aumento de la cantidad total de ácidos biliares que favorecen la solubilización micelar del colesterol
- Formación de una mesofase líquido-cristalina que permite solubilizar el colesterol más eficientemente, y esta se puede obtener en la fase de equilibrio.

El ácido ursodesoxicólico es considerado el más importante farmacológicamente; en comparación al ácido quenodesoxicólico en la terapia contra los cálculos biliares, ya que posee una alta eficacia y la ausencia total de efectos secundarios. (Martindale, 2003)

1.8.1 Síntesis química de los ácidos biliares de interés farmacéutico

El ácido ursodesoxicólico es un ingrediente activo muy caro, ya que en años pasados se conocía como única fuente de obtención al del oso panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*), del que se extraía la bilis. Actualmente existen varios procesos de síntesis para su obtención, y en cuanto al ácido cólico y quenodesoxicólico que provienen de origen bovino a través de gran cantidad de reacciones químicas; las cuales se caracterizan por los altos costos y alto impacto ambiental. (Baldassare, Bertoni, Chiappe, & Marioni, 2000)

El interés farmacéutico ha llevado a la necesidad de producir grandes cantidades de Ácido Ursodesoxicólico, que ha desencadenado en el desarrollo de metodologías

sintéticas, que se utilizan como productos de partida, conjugados de sales biliares o por taurinatos y glicinatos del ácido cólico y quenodesoxicólico de la especie bovina. (Baldassare, Bertoni, Chiappe, & Marioni, 2000)

El ácido cólico es el principal constituyente de la bilis y, normalmente, es el sustrato de partida principal para la síntesis de fármaco activo de interés. Inicialmente la bilis se somete a una hidrólisis alcalina para liberar ácidos biliares que son fisiológicamente conjugados con taurina y glicina, esta reacción requiere el uso de grandes cantidades de Hidróxido de Sodio (NaOH) aproximadamente un 30% y además de altas temperaturas llegando a 120 ° C durante tiempos extremadamente largos, aproximadamente de 8 a 12 horas. (Baldassare, Bertoni, Chiappe, & Marioni, 2000)

1.9 Biotransformación

1.9.1 Hidroxilación

Los ácidos biliares más comunes presentan como base la estructura del ácido colánico con las posiciones 3 y 7 hidroxiladas por lo general, con orientación α , siendo el ácido ursodesoxicólico la gran excepción. Los ácidos biliares C24 suelen presentar con más o menos frecuencia un grupo hidroxilo adicional, ya sea en el núcleo o en la cadena lateral. La hidroxilación en la cadena lateral se realiza en la posición C23, generando los ácidos α -hidroxi biliares, o en la C22, constituyendo los ácidos β -hidroxi biliares. Esta hidroxilación en el núcleo puede tener lugar en varios lugares: 1α , 1β , 2β , 4β , 5β , 6α , 6β , 12α , 12β , 15α , 16α y 19β .

Los hidroxilaciones representan uno de los tipos más extendidos de biotransformaciones que se buscan en el campo de los esteroides. Son extremadamente importantes porque permiten insertar un pequeño grupo hidroxilo reactivo en posiciones de la molécula haciendo posible la preparación de compuestos intermedios importantes para la síntesis química o la transformación directamente el producto de partida en un bioactivo esteroides. En la literatura se ha reportado

hidroxilaciones microbianas de posiciones que van desde la C-1 a C-21 y C-26 de la posición. (Maldonado, 2013)

1.9.2. $\Delta 1$ -deshidrogenación

El 7α -deshidroxilación de la bilis primaria ácidos CA y CDCA para producir los correspondientes ácidos biliares secundarios, ácido desoxicólico y ácido litocólico, se considera una de las biotransformaciones más importantes de esta clase de compuestos siempre vista en perspectiva de una hidroxilación posterior que conduce a epimerización de la posición C-7. También es interesante la deshidroxilación en C-12 de cólico al ácido quenodesoxicólico.

Algunos cultivos puros de bacterias se han aislado de la flora intestinal humana y se seleccionan por su capacidad para eliminar el 7-OH de la CA. Se ha informado de que sólo unas pocas cepas son capaces de dehidroxilar el CA en la posición C-7: 26. En particular, esta actividad se ha observado en *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium*, y en muchas cepas de *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus* pero no en *Bifidobacterium*. (Maldonado, 2013)

1.9.3. Epimerización

Los procesos de epimerización, que dependen principalmente de las funciones hidroxilo, se han estudiado ampliamente ya que permiten la producción de 3β -y, en particular, los ácidos biliares 7β -hidroxi (tal como ácido ursodesoxicólico). Se puede hacer tanto por el óxido-reductora, teniendo como intermedio el correspondiente chetoderivati, 16 ya sea por deshidroxilación y la consiguiente β -hidroxilación.1 Las enzimas que participan en estas reacciones son, en el primer caso, 7α e 7β -hidroxiesteroide deshidrogenasa NAD (P)⁺, dependiente, mientras que en el segundo caso se trata de 7α -deshidroxilasa α -hidroxiesteroide junto con hidroxilasa 7β -hidroxiesteroide. Otras enzimas redox importantes son NADH-deshidrogenasa o NADPH-dependiente pueden oxidar y reducir regioselectivamente la posición C-12 del ácido colico.

Se ha informado en la literatura que la epimerización del grupo hidroxilo presente en la posición C-7 de los ácidos correspondientes de ácido cólico y quenodesoxicólico y Ursodesoxicólico, ursocolico en presencia de bajas concentraciones de oxígeno. Esta transformación es catalizada por *Xanthomonas maltophilia* CBS 827.97. (Maldonado, 2013)

1.10 Técnicas metodológicas

1.10.1. Descripción de medios de cultivo

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

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

En relación con las bacterias y hongos, no se utilizó medios específicos de crecimiento ya que no se conoce de medios de cultivo que permitan solo el crecimiento de microorganismos con capacidad de biotransformación, se decidió utilizar medios mínimos para poder así aislar dichos microorganismos. En ambos casos se añadió al medio la sal de ácido biliar para que pudieran crecer microorganismos que fuesen afines a las condiciones específicas dadas por la combinación del medio con la sal del ácido biliar. Y para los hongos se añadió cloranfenicol para asegurar el crecimiento solo de los microorganismo de interés.

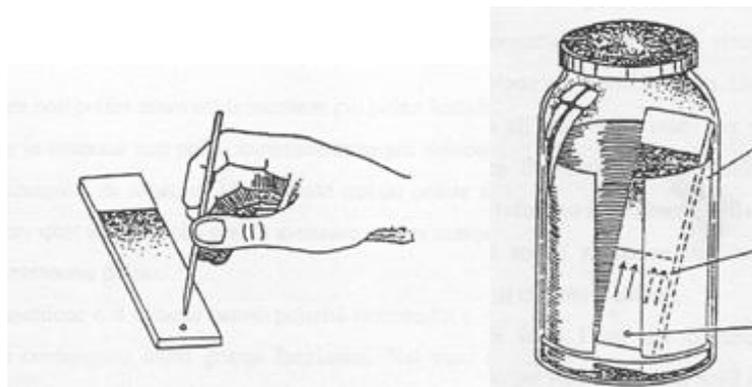
1.10.2. Análisis de cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada; entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado.

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente. (Ahmad, Garg, & Johri, 1992)

Figura N° 14: Cromatografía en capa fina (TLC)



Modificado de: (Villagomez, 2008)

1.10.3. Identificación del género de los microorganismos

1.10.3.1. Tinción Gram

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

pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas. (Santambrosio, E, 2009)

1.10.3.2. Secuencia de la tinción

- El Frotis fijado con calor se tiñe 1 min con Cristal Violeta
- Se lava con agua destilada
- Se cubre con solución Yodada durante 1 - 2 min.
- Se lava de nuevo con agua destilada
- Decolorar con mezcla alcohol etílico/acetona.
- Escurrir y cubrir con Safranina (color de contraste) durante 1 – 2 min.
- Lavar y secar.

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas se tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. (Santambrosio, E, 2009)

La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano. (Santambrosio, E, 2009)

1.10.3.3. Prueba API

El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de ensayo de micropocillos separadas (GNA y GNB). Cada tira de prueba 12 sustratos bioquímicos estandarizados que han sido seleccionados en función de análisis informático muy extenso de la base de datos publicadas para la identificación de la familia

Enterobacteriaceae y los microorganismos Gram negativos oxidasa positivos y negativos no-exigentes más comunes. Los sustratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una solución salina del organismo a identificar. Si los sustratos son metabolizados por el organismo, se observa un cambio de color durante la incubación o después de la adición de los reactivos específicos. La permutación de sustratos metabolizados se puede interpretar mediante el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el organismo de prueba. (Microgen, 2013)

Las tiras de GN A han sido diseñadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivas que incluyen los géneros más comunes de la familia *Enterobacteriaceae*. Este sistema utiliza 12 (GN A) o 24 (GN A+B) sustratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no-exigentes Gram negativos (oxidasa negativos y positivos). El kit se ha diseñado solo para uso profesional. Este sistema de identificación tiene un porcentaje de efectividad del 99%. (Microgen, 2013)

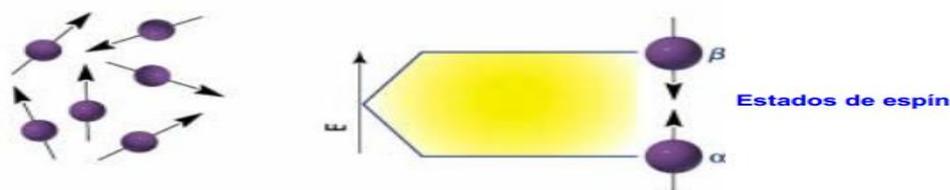
1.10.4. Resonancia magnética nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RNM), es considerada como una herramienta que permite obtener una gran cantidad de información sobre la estructura molecular. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes.

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la siguiente figura, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del

campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β . (Dyer, 2000)

Figura N°15: Orientación de los espines nucleares



Fuente: (Dyer, 2000)

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación rf. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación rf. Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación rf a la que son sometidos. (Dyer, 2000)

Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical. En los aparatos modernos el campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación rf excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de

energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad en relación a la frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN). Un espectro FT-RMN puede registrarse en 2 segundos utilizando menos de 5 mg de muestra. (Dyer, 2000)

1.11 Determinación de zonas de muestreo

Para determinar las zonas de muestreo donde se obtendrían los microorganismos objetos de estudio, se realizó el análisis de la situación de los camales en el Ecuador, para poder conocer el tratamiento que le daban a sus desechos de faenamiento y la situación ambiental en la que se encontraba cada camal. Fue necesario realizar este estudio para identificar los camales que serían mejor fuente de obtención de estos microorganismos. A partir de este estudio se logró identificar que los Camales de Latacunga y Cayambe por su situación ambiental crítica, serían las mejores fuentes de aislamiento, ya que no daban un manejo adecuado de los residuos.

Se pretende tener información de los Camales en el Ecuador para que a partir de este estudio se puedan realizar investigaciones en el mismo campo, teniendo como referente la situación ambiental, manejo de residuos y gestión de la bilis de cada camal. Se dio énfasis a estos tres aspectos ya que conocer que se hace después de la obtención de la bilis en los procesos de faenamiento, permitirá vincularnos a nuevos mercados y generar recursos en cuanto a la biotransformación de los ácidos biliares y sus procesos.

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Recolección y asilamiento de microorganismos

La toma de muestras de los hongos y las bacterias se realizó en los camales municipales de las ciudades de Latacunga y Cayambe, en la zona andina del Ecuador, el 12 de octubre 2010.

2.1.2 Descripción de la zona del matadero del camal de Latacunga

Las paredes están cubiertas de azulejos blancos, los suelos son de mármol. Las mesas son de acero inoxidable. Las vísceras y despojos se recogen en recipientes de plástico. La limpieza se realiza después del faenamiento con agua y detergente, y una vez a la semana, cloro. La ubicación del camal es en las afueras de la ciudad en zonas cercana a ríos.

2.1.2.1. Áreas de muestreo

Las muestras fueron tomadas en las siguientes áreas:

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

A2- Zona de recolección de vísceras.

A3- Canales de agua internos de la planta: se toman muestras de esta área ya que también se pueden encontrar microorganismos con capacidad de biotransformación debido a que dentro del proceso de faenamiento de los animales las aguas que están en constante circulación pasan por los canales de agua con carga microbiana y son considerados una fuente de obtención de microorganismos.

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

2.1.3 Descripción de la zona del matadero del camal de Cayambe

Las paredes están cubiertas de azulejos blancos, los suelos son de mármol. Las mesas son de acero inoxidable. En camal cuenta con una separación de áreas para las diferentes actividades de faenamiento, para borregos, cerdos y reces. Adicionalmente el camal de Cayambe cuenta con un cuarto frío.

2.1.3.1. Áreas de muestreo

Las muestras fueron tomadas en las siguientes áreas:

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

A2- Zona de recolección de vísceras: paredes de intestinos, contenido del estómago de los animales y vísceras de procesamiento.

A3- Canales de agua internos de la planta: se toman muestras de esta área ya que también se pueden encontrar microorganismos con capacidad de biotransformación a pesar de que no es un elemento principal de obtención.

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

2.2 Listado de cepas y mantenimiento

2.2.1 Procedimiento de aislamiento de bacterias

- Se preparan tubos de ensayo con 5 ml de solución salina con hisopos de algodón, los cuales fueron debidamente esterilizados, etiquetados y guardados en refrigeración; y transportados en cadena de frío.
- La toma de muestras se realiza dando prioridad a las zonas del camal en donde se está trabajando con las vísceras y de acuerdo a la observación del proceso que se consideran áreas críticas.
- La toma de muestras se realiza con el hisopo estéril de algodón, poniéndolo en contacto directo con la superficie a muestrear, se coloca el hisopo con la

muestra dentro de la solución fisiológica hasta que este sumergido por completo y se cierre el tubo.

- Las muestras tomadas en el camal son transportados a Quito (89 km al norte de Latacunga y 73km al norte de Cayambe) en un culler con bloques de refrigerante congelados, manteniendo la temperatura a 4 ° C.
- Las muestras son llevadas a la Universidad Politécnica Salesiana a los laboratorios del CIVABI, y se mantienen en refrigeración a una temperatura de 0 ° C.
- Se realiza una serie de diluciones y se selecciona la dilución 10^{-4} por ser la que permite aislar los microorganismos. Se siembran en dos cajas Petri que contiene Plate Count Agar (Difco) al que se añadieron 5 % de sal de sodio de cada uno de los ácidos (hyodesoxicólico y desoxicólico).
- Después de 24 h de crecimiento de los microorganismos aislados se siembran en nuevas cajas Petri que contienen el mismo medio (pero sin la sal del ácido biliar), hasta el aislamiento de cepas.
- A las cepas aisladas se le asigna un código de identificación (Tabla 2).

Tabla 2. Bacterias aisladas en el camal de Latacunga

Lugar de muestreo	Código final
Canal de agua dentro de la planta	MM B1
Recipiente de recogida de los intestinos	MM B2
Área de almacenamiento de la piel	MM B3
Canal interno de agua para el sistema	MM B4
Recipiente colector de las vesículas	MM B5
Tabla de recibimiento de los intestinos	MM B6
Área de procesamiento del animal	MM B7
Canal externo de agua de la planta	MM B8
Área de procesamiento del animal	MM B9
Área de recolección de los intestinos	MM B10
Tabla de recibimiento de los intestinos	MM B11
Recipiente que contiene el rumen	MM B12
Canal externo de agua de la planta	MM B13

Piso de almacenamiento de la piel del animal	MM B28
Recipiente colector de las vesículas	MM B41
Piso del área de desvicramiento	MM B60

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Tabla 3. Bacterias aisladas en el camal de Cayambe

Lugar de muestreo	Código final
Contenido del estómago de los animales en estado de alimentación	MM B14
Recipiente de recogida de los intestinos	MM B15
Recipiente de recogida de los intestinos	MM B16
Procesamiento de los intestinos	MM B23
Piso de recolección de las cabezas	MM B24
Paredes de sala de matanza	MM B25
Paredes y piso de zona de destripado	MM B26
Procesamiento de los intestinos	MM B27
Paredes de sala de matanza	MM B29
Sección de recolección de ubres	MM B30
Piso y paredes del área de evisceración	MM B31
Paredes laterales del intestino	MM B32
Paredes de sala de matanza	MM B 33
Zona de recepción de vísceras	MM B34
Paredes de la zona de mecanizado del animal	MM B35
Contenedor de los intestinos situado en el camal	MM B36
Piso y paredes del área de evisceración	MM B 37
Vísceras de procesamiento de mesa	MM B39
Contenido del estómago de los animales en estado de alimentación	MM B40

Lavabo A de la piedra	MM B42
Paredes de la zona de mecanizado del animal	MM B43
Vísceras del procesamiento	MM B44
Vísceras del procesamiento de mesa	MM B45
Superficie del procesamiento de los animales	MM B46
Vísceras de la zona de recepción	MM B47
Vísceras de la zona de recepción	MM B48
Vísceras de la zona de recepción	MM B51
Recipiente de recogida de los intestinos	MM B53
Paredes de zona de matanza	MM B54
Paredes de la zona de mecanizado del animal	MM B55
Paredes laterales del intestino	MM B56
Paredes de la zona de mecanizado del animal	MM B57
Vísceras de la zona de recepción	MM B59
Superficie desprendimiento	MM B61
Paredes laterales del intestino	MM B62
Recipiente de recogida de los intestinos	MM B63
Vísceras de la zona de recepción	MM B64
Paredes de la zona de mecanizado del animal	MM B65
Equipo de procesamiento de los animales	MM B66
Contenido del estómago de los animales en estado de alimentación	MM B67
Vísceras de la zona de recepción	MM B68
Paredes de zona de matanza	MM B69
Lavabo C	MM B70
Superficie	MM B71
Paredes del camal	MM B72

Mesa del rumen	MM B73
Baño	MM B74

Elaborador por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

2.2.2 Procedimiento de aislamiento de hongos

- Las diversas muestras (dilución 10^{-4} por ser la mejor de las diluciones para el aislamiento de los microorganismos) se siembran en dos cajas Petri que contiene Agar dextrosa Sabouraud (Difco) con cloranfenicol, que es un antibiótico que se añade medio para asegurar el crecimiento exclusivo de los hongos. Se añade 1% del antibiótico y 5% de la sal de sodio de los ácidos biliares (hyodesoxicólico y desoxicólico).
- Después de 7 días de incubación a temperatura ambiente en las cajas Petri se analiza los hongos y se realiza las resiembras necesarias en las nuevas cajas hasta el aislamiento de las cepas.
- Para los aislamientos se le asigna un código de identificación (Tabla 4).

Tabla 4. Hongos aislados en el camal de Latacunga

Lugar de muestreo	Código final
Tabla de recibimiento de los intestinos	MM F4
Recolección de la superficie donde se depositan los intestinos	MM F12
Área de tratamiento de aguas canal interno	MM F14
Recolección de la superficie del área donde se depositan los intestinos	MM F15
Contenedor del rumen	MM F16
Recolección de la superficie del área donde se depositan los intestinos	MM F18
Recolección de la superficie del área donde se depositan los intestinos	MM F19
Recolección de la superficie del área donde se depositan los intestinos	MM F21

Recolección de la superficie del área donde se depositan los intestinos	MM F22
Área de recolección de la piel	MM F23
Contenedor de rumen	MM F24
Recolector externo de las vesículas	MM F26
Recipiente colector de rumen	MM F27
Recolección de la superficie del área donde se depositan los intestinos	MM F29
Recolección de la superficie del área donde se depositan los intestinos	MM F30
Recipiente recolector de las vesículas	MM F31
Recipiente recolector de las vesículas	MM F33
Recipiente recolector de rumen	MM F34

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Tabla 5. Hongos aislados en el camal de Cayambe

Lugar de muestreo	Código final
Paredes laterales del intestino	MM F1
Vísceras de la zona de recepción	MM F2
Rampa de entrada de chanchos	MM F3
Paredes de zona de matanza	MM F5
Espacio exterior a la zona de matanza	MM F6
Paredes laterales del intestino	MM F7
Paredes laterales del intestino	MM F8
Vísceras de la zona de recepción	MM F9
Espacio exterior a la zona de matanza	MM F10
Vísceras de procesamiento de mesa	MM F11
Rampa de entrada de chanchos	MM F13
Área de corte de carne	MM F17
Paredes de zona de apuñalamiento	MM F20
Recipiente colector de las vesículas	MM F25
Paredes de zona de apuñalamiento	MM F28

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

2.3 Preparación de caldos de cultivo

2.3.1 Preparación de caldo de cultivos para bacterias

El caldo de cultivo Plate Count Broth (PCB) para bacterias contiene los siguientes componentes para 1000ml:

- Glucosa 2g
- Levadura 5g
- Triptona 10g

Este es un medio mínimo que favorece el crecimiento solo de bacterias que sirven para evaluar la sensibilidad del microorganismo ante el caldo de cultivo. Seguidamente el caldo de cultivo preparado es dispensado en erlenmeyers de 50ml (10ml en cada Erlenmeyer) para ser llevados al autoclave y esterilizar.

2.3.2 Preparación de caldo de cultivos para hongos

Se prepara la cantidad necesaria para los erlenmeyers a utilizarse, sabiendo que 30g de Sabouraud Dextrosa Broth (SDB) son necesarios para 1000ml de agua destilada. Este es un medio mínimo que favorece el crecimiento solo de hongos. Se dispensa el caldo de cultivo 20ml en cada erlenmeyer para ser llevados al autoclave procediendo a su esterilización.

2.3.3 Preparación del ácido biliar

Se preparó el estándar con 250 ppm de sal biliar en 5ml de agua destilada, teniendo 10 ppm de sal biliar en 0,2 ml de agua destilada, para la alimentación de los microorganismos.

2.3.4 Preparación de revelador

Ácido Fosfomolídico en medio ácido cuya composición es:

- 15 gramos de Ácido Fosfomolídico
- 30ml de Ácido Acético Glacial
- 15g de Ácido Sulfúrico

Se prepara el revelador con estos componentes, ya que estos muestran las estructuras esteroideas.

2.3.5 Preparación del estándar para placas cromatográficas

En algunos ácidos biliares con microorganismos adecuados se producen reacciones específicas de ciertos ácidos (hyodesoxicólico y desoxicólico) proporcionándole el ácido biliar, en este caso a la *Pseudomona paucimobilis* que con el ácido desoxicólico producirá una oxidación en el carbono 3, y éste será utilizado como referente para las placas cromatográficas de las diferentes bacterias a analizar. Al obtener una oxidación de moléculas en una posición determinada se obtienen productos oxidados, obtenidos mediante un cultivo preparativo que es soluble en Acetato de Etilo y se utilizan como estándares de referencia.

2.4 Monitoreo de hongos y bacterias

2.4.1 Procedimiento general para bacterias

Se preparan cultivos en medio Plate count broth (PCB) líquido (10 ml en erlenmeyers de 50ml) utilizando como inóculo una bacteria aislada con una asa estéril. Después de 48 h de crecimiento a 30 ° C con agitación continua (100-110 rpm) se inocula los diversos sustratos (1 g / L, 100ul de solución preparada por disolución de 100ppm). Después de la administración de las sales sódicas de los ácidos biliares (hyodesoxicólico y desoxicólico), de interés, se mantiene otras 48 horas a 30 ° C con agitación continua. Se tomaron muestras de 200ul cada 24 h se acidifica con HCl y se extrae con acetato de etilo la fase acuosa, posteriormente se lleva a la centrifuga durante un minuto a 6000 rpm. La fase orgánica se analiza por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como fase móvil una mezcla de compuestos orgánicos según la polaridad de las moléculas, determinando así la mejor fase móvil para nuestra investigación. Se contó con las siguientes fases móviles: fase móvil 1, en proporción 50:2 (50ml de acetato de etilo, 2ml de ácido glacial acético), fase móvil 2, en concentraciones 70:30:2 (70ml de acetato de etilo, 30ml de hexano, 2ml de ácido glacial acético).

Se corta la placa de cromatografía y con lápiz se señala el lugar donde se colocará (2cm del borde inferior de la placa cromatográfica) el estándar y las bacterias respectivamente. Se coloca el estándar con un capilar, luego en cada separación se coloca las bacterias. Se toma el capilar y se lava con acetato de etilo antes de cada siembra, luego se coloca el estándar de dos a tres veces. Se lava el capilar y se toma la muestra de cada bacteria cuatro veces aproximadamente. Se secan las muestras en la placa y se lleva a su fase móvil escogida, se deja que la misma corra (hasta 1cm antes del borde superior de la placa cromatográfica). Secar la fase móvil con la ayuda de calor y con el nebulizador rociar, con una solución que contiene ácido fosfomolídico ($H_3Mo_{12}O_{40}P$), ácido sulfúrico y ácido acético en proporciones 2.5:2.5:5, dentro de la sorbona a la placa y calentarla (aproximadamente 120 ° C) con el fin de hacer visibles los productos de la reacción.

2.4.2 Procedimiento general para hongos

Son cultivos preparados en medio líquido Sabouraud Destroxa Broth (SDB) (20 ml en erlenmeyers 50ml) utilizando como inóculo un hongo aislado con una asa estéril. Después de 4 días de crecimiento a 30 ° C con agitación continua (100-110 rpm) se inocula los diversos sustratos (1 g / L, 200 ul de solución preparada por disolución de 100ppm). Después de la administración de las sales sódicas de los ácidos biliares (hyodesoxicólico o desoxicólico), de interés, se mantiene otras 48 horas a 30 ° C con agitación continua. Se tomaron muestras de 200ul cada 24 h se acidifica con HCl y se extrae con acetato de etilo la fase acuosa, posteriormente se lleva a la centrifuga durante un minuto a 6000 rpm. La fase orgánica se analiza por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como fase móvil una mezcla de compuestos orgánicos según la polaridad de las moléculas, determinando así la mejor fase móvil para nuestra investigación. Se contó con las siguientes fases móviles: fase móvil 1, en proporción 50:2 (50ml de acetato de etilo, 2ml de ácido glacial acético), fase móvil 2, en proporción 70:30:2 (70ml de acetato de etilo, 30ml de hexano, 2ml de ácido glacial acético).

Se corta la placa de cromatografía y con lápiz se señala el lugar donde se colocará (2cm del borde inferior de la placa cromatográfica) el estándar y los hongos

respectivamente. Se coloca el estándar con un capilar, luego en cada separación se coloca los hongos. Se toma el capilar y se lava con acetato de etilo antes de cada siembra, luego se coloca el estándar de dos a tres veces. Se lava el capilar y se toma la muestra de cada hongo cuatro veces aproximadamente. Se secan las muestras en la placa y se lleva a su fase móvil escogida, se deja que la misma corra (hasta 1cm antes del borde superior de la placa cromatográfica). Secar la fase móvil con la ayuda de calor y con el nebulizador rociar a la placa con una solución que contiene ácido fosfomolibdico ($H_3Mo_{12}O_{40}P$), ácido sulfúrico y ácido acético en proporciones 2.5:2.5:5 dentro de la sorbona y calentarla (aproximadamente 120 ° C) con el fin de hacer visibles los productos de la reacción.

2.5 Escalamiento de cultivos de bacterias y de hongos

Preparar caldo de cultivo para bacterias y hongos con la metodología anteriormente mencionada, para bacterias 100ml y para hongos 200ml.

2.5.1 Bacterias

- Posteriormente en erlenmeyers de 50 ml y en una cámara de flujo laminar, proceder a la siembra de las bacterias y hongos respectivos (10ml para bacterias y 20ml para hongos).
- Incubar bacterias por 48 horas en los erlenmeyers de 50ml y después pasar a los de 250ml con 100ml de caldo de cultivo e incubar las bacterias por 72 horas con agitación constante a 110 rpm y a 30° C. Pasadas las 72 horas con cada sal de ácido biliar colocar 100mg del mismo en los erlenmeyers.

2.5.2 Hongos

- Incubar los hongos por 48 horas, en los erlenmeyers de 50ml, después pasarlos a los erlenmeyers de 250ml con 200ml de caldo de cultivo, incubar por 72 horas y alimentar a los hongos con 200mg con cada sal de ácido biliar.

2.6 Extracción de la parte activa metabolizada por las bacterias y hongos

- En la cámara de flujo laminar dispensar el caldo de cultivo más la bacteria o el hongo en dos tubos desechables hasta 40 ml.
- Coincidir los tubos de contra peso con agua (tener el peso exacto)
- Centrifugar por 20 minutos a 3500 rpm.
- Dispensar el sobrenadante en un recipiente de vidrio.
- Colocar el contenido del recipiente en un embudo de separación, todo este proceso siguiente debe ser realizado en una Sorbona.
- Añadir 1 ml de HCl (38%).
- Mezclar hasta q se obtenga un producto homogéneo.
- Con un gotero o pipeta Pasteur, extraer una gota para controlar el pH que no debe pasar de 3.
- Colocar 100ml de Acetato de Etilo en la mezcla.
- Agitar el embudo de separación manualmente aproximadamente 80 veces, sacando el aire periódicamente.
- Dejar en reposo y observar la separación de las dos fases una acuosa y otra con Acetato.
- Devolver la fase acuosa al recipiente de vidrio.
- Colocar 50ml de Acetato de Etilo y repetir la agitación ya descrita.
- Repetirlo una vez más hasta q no queden residuos acuosos.
- Colocar 5 g de Sulfato de sodio anhidro en la fase orgánica para q este atrape todas las moléculas de agua restantes.
- Filtrar el contenido con papel filtro en un balón aforado.
- Llevar a rota vapor para concentrar
- En un vial colocar la muestra concentrada, utilizar nitrógeno para evaporar el acetato de etilo restante y posteriormente analizarlo con resonancia magnética nuclear.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

3.1.1. Situación de los camales en el Ecuador

Dentro del proyecto de investigación se realizó la validación de los datos para una posible aplicación con respecto a la disminución del impacto ambiental. Se investigó sobre el manejo que se le da a los residuos en diferentes ciudades del Ecuador agrupando el trabajo por regiones, dividiéndose así para los integrantes del proyecto de la siguiente manera. Los camales de: Ambato, Riobamba, Pedernales, Guayaquil, y Antonio Ante, fueron investigados por Andrés Daza y Juan Carlos Pineda por lo que señalaremos los aspectos más representativos. Los camales de Quito, Latacunga y Cayambe fueron el centro de nuestra investigación y serán los que ampliaremos en cuanto al manejo ambiental que tienen dichas administraciones.

En cada uno de los camales se evaluó la provincia, cantón, parroquia, gestión de la basura e impacto ambiental para determinar la situación con respecto a la contaminación que puede producir a zonas aledañas al camal y los distintos tratamientos de residuos que da cada administración.

3.1.2. Camal Municipal de Ambato

Provincia: Tungurahua

Cantón: Ambato

Parroquia: Izamba

Sector: Parque Industrial

Para acceder al servicio del faenamiento se debe pagar una cuota de \$17,35, también requiere de una tarjeta de que tiene un costo anual de \$ 85 para sacrificar grandes cantidades (más de 50 animales) y \$ 40 para los volúmenes son más bajos (menos de

50 animales sacrificados). Los otros gastos (transporte de las vísceras, el transporte de carne, diversos permisos, etc.) Correrán a cargo de las arcas municipales.

- **Gestión de la bilis:** La bilis en el matadero municipal de Ambato se recoge en tanques de 220 litros (cada mes produce cerca de 3 tanques), que luego se venden a 85 dólares cada uno. Se trata de una estimación cuantitativa de 600 litros que se venden a un comprador en Colombia para la producción de la bilis en el pasado, que se comercializa en el extranjero.
- **Impacto ambiental:** En la visita al matadero se observó que se produjo alrededor de 7 m³ de rumen por día, y entre 12 y 15 litros de sangre por animal. Los residuos líquidos, incluida la sangre, son transportados como tal en el sistema de alcantarillado sin ningún tratamiento previo dirigido a la prevención de la contaminación ambiental y los residuos sólidos se vierten en los rellenos sanitarios, pudiendo observar que se produce un alto grado de contaminación.

3.1.3. Camal Municipal de Riobamba

Provincia: Chimborazo

Cantón: Riobamba

Se encuentra en la Avenida Leopoldo Freire salida sur - este de Cantón Chambo, junto con la empresa Tubasec, al lado del gran mercado de productos agrícolas. El camal proporciona servicios a los ciudadanos como la aceptación de los animales de empresas privadas para ser sacrificados, la cría de animales para el faenamiento, etc. El número de animales sacrificados es de 120 a 130 bovinos, 350 cerdos y 350 ovejas al día y esta actividad se lleva a cabo durante cuatro días a la semana durante un número mensual de unos 2.500 bovinos.

- **Gestión de la bilis:** se recoge la vesícula biliar del ganado para su venta mientras que en los procesos primarios no se realizan operaciones de tratamiento previo para la separación de la bilis por la recolección de datos.

- **Otros residuos:** El único residuo que recibe tratamiento adicional para la comercialización es la sangre del ganado, con el que se produce un animal de harina de sangre que se utiliza como alimento para animales.
- **Impacto ambiental:** El camal municipal de Riobamba es una empresa que produce diversos residuos sólidos orgánicos (estiércol, el pelo, la grasa, trozos de carne, huesos y demás partes comestibles) que causan graves problemas ambientales del agua, suelo y aire. La cantidad de estos residuos, no aptos para el consumo humano, varía de 20 a 50% (en función del tipo de animal): la mayoría son residuos putrescibles y deben manejarse con cuidado para evitar los olores y la propagación de la enfermedad.

3.1.4. Camal Municipal de Pedernales

Provincia: Manabí

Cantón: Pedernales

Ubicación: 5.5 km de la carretera que conduce a San Vicente, proporciona servicios de custodia. El número aproximado faenamiento semanal es de 26 bovinos y 50 cerdos. Estos números son aproximados y pueden variar durante el año.

- **Gestión de la bilis:** La bilis producida por el proceso de faenamiento de ganado y cerdos no se somete a ningún tratamiento, no se vende o se usa, pero simplemente se retira junto con otros residuos. En promedio, la cantidad de bilis por vaca es igual a 230 ml. Los valores oscilan entre 150 ml y 600 ml
- **Otros residuos:** Sólo el rumen se comercializa después de haber sido recogido en un tanque con capacidad de 220 litros y se vende a un precio de \$ 200 por tanque. Se producen alrededor de dos tanques por día. Los residuos líquidos como la sangre se almacenan en un tanque. Los residuos sólidos se recogen todos los días de un camión que transporta todos los residuos al relleno sanitario municipal, 25 % del peso total de los animales vivos pueden considerarse como residuos (estiércol, el contenido del estómago, sangre, huesos, pelo, pezuñas, cuernos, fragmentos de tejido adiposo, conjuntivo y muscular, etc.)

- **Impacto ambiental:** El vertedero municipal está a 16 km de la ciudad, camino de Jama, a 2 km antes del Palmar. En este lugar se depositan los residuos sin ningún tipo de normas de salud y esta es un área particularmente susceptible a la contaminación del medio ambiente con las enfermedades consiguientes.

3.1.5. Camal Municipal de Guayaquil

Provincia: Guayas

Cantón: Guayaquil

Ubicación: Barrio Cuba, en una zona densamente poblada)

Es una empresa en la que el ganado y los cerdos son sacrificados para los mercados privados en la provincia de Guayas, principalmente en la ciudad de Milagro.

- **Gestión de la bilis:** El camal municipal de Guayaquil se utiliza para el faenamiento de ganado bovino y porcino. Hay gente que paga para la masacre y que tengan absolutamente todos los residuos animales que no se utilizan como la bilis. Estos comerciantes, así como a la masacre a su ganado para vender la empresa Nunsa, una empresa que procesa la bilis y lo vende en el extranjero.
- **Otros residuos:** Durante las actividades de producción en el camal se generan residuos sólidos y líquidos. En el camal municipal, durante el proceso de faenamiento de ganado y cerdos, se genera los siguientes residuos sólidos: Los residuos derivados de la sanidad, la sangre, trozos de grasa, restos de comida, cráneos, orejas, cola, cuernos, huesos, garras, piel, pelo.
- **Impacto ambiental:** La sangre coagulada, los residuos resultantes de la sanidad, el estiércol, los pedazos de grasa, el pelo, las manos, las orejas, la cola, cuernos, huesos y las mandíbulas son enviados al relleno sanitario. Piel animal se retira de nuestros clientes del matadero. Los residuos líquidos que contienen la sangre, la grasa y las heces. Son arrojados a los drenajes después de ser filtrada a través de un tamiz para retener los sólidos más voluminosos.

3.1.6. Camal Municipal de Latacunga

Provincia: Cotopaxi

Cantón: Latacunga

Ubicación: San Martín del distrito parroquia Juan Montalvo

Ofrece todos los servicios de sacrificio, incluidos los despojos, pieles y otros productos a sus propietarios. El proceso de faenamiento no está equipado con cámaras frigoríficas para la conservación de la carne después de que el proceso de matanza. Por esta razón, sólo ofrece el servicio de matar el ganado. El sacrificio de cerdos y ganado vacuno mensual origina alrededor de 20 toneladas de heces y sangre en los ríos cercanos.

Impacto ambiental

En cuanto a este tipo de actividad no hay controles diarios sobre los servicios que se llevan a cabo dentro del camal, tampoco se vigila la situación de los cursos de agua donde son arrojados los residuos sólidos y líquidos (ríos Yanayacu y Cutuchi). En cuanto al diseño de los vertidos líquidos, no es compatible con la legislación vigente para las descargas en cuerpos de agua, ya que el camal no maneja adecuadamente el tratamiento de sus desechos produciendo un grado de contaminación.

3.1.6.1. Proceso de faenamiento camal de Latacunga

Previo al faenamiento los animales son sometidos a un ayuno de 24 horas

El proceso de sacrificio del ganado consta de los siguientes pasos:

- El animal es llevado a una habitación donde, después de estar mojado, se somete a una descarga eléctrica para el aturdimiento.
- Se cuelga el animal de una de sus patas para su desangramiento, y se lo sujeta con una cadena.
- Paralelamente se hace una incisión en otra de las patas delanteras, y se engancha la piel a un sistema mecánico que facilita su remoción.

- El animal se moviliza al interior del camal mediante un sistema mecánico de transporte, por el cual es conducido a un área en donde se abre la panza del animal, se hace el vaciado de vísceras, sobre un área con infraestructura de acero inoxidable, donde se recolecta y clasifica el material, que luego se reúne e diferentes recipientes plásticos: rumen, intestinos, hígados, vesículas biliares, para luego ser vendidos a consumidores locales, o es botada generalmente a los ríos vecinos, constituyéndose en una fuerte contaminación ambiental.
- Luego el animal desvicerado es transportado al área de corte.
- Seguidamente es entregado en pedazos al propietario, (generalmente vendedores locales de carne), quienes llevan las pizzas de carne a los puntos de venta.

3.1.7. Camal Municipal de Antonio Ante

Provincia: Imbabura

Cantón: Antonio Ante

Ubicación: Panamericana Norte sector Catabamba, Parroquia Natabuela)

El faenamiento de Antonio Ante proporciona servicios de almacenamiento para el ganado, masacre, la refrigeración y el transporte de las canales. También dispone de otras instalaciones para el lavado de las vísceras.

- **Gestión de la bilis:** No se dispone de información para el tratamiento llevado a cabo en la bilis en el camal. En la zona donde se vacían las entrañas de los animales hay una rampa que conduce a las vísceras, tanto en blanco y rojo, la zona de lavado, donde algunas personas, que no pertenecen a la masacre , manejan estos productos
- **Impacto ambiental:** El camal genera una serie de residuos sólidos orgánicos que causan graves problemas ambientales del agua, suelo y aire, ya que no se gestionan adecuadamente. Es el estiércol el pelo, la grasa, trozos de carne,

huesos y demás partes comestibles. Todos estos restos son arrojados a la red de alcantarillado.

3.1.8. Camal Municipal de Cayambe

Provincia: Pichincha

Cantón: Cayambe

Ubicación: Puerto Baquerizo vía S / N y Rocafuerte a seis calles de distancia del hospital Raúl Maldonado Mejía) tiene áreas de aturdimiento para bovinos, porcinos y ovinos, y la zona de evisceración para lavar la zona del intestino. También cuenta con una zona para ganado vacuno y ovino a un lado y una pocilga detrás de la zona de matanza.

Gestión de la bilis

En el momento presente no se proporciona un servicio para el tratamiento de la bilis en el camal y no hay gestión para el tratamiento de las vísceras, su disposición final es desecharla a los ríos o vertientes cercanas al sector.

Otros residuos

En el camal de Cayambe se mata un promedio de 8 cabezas de ganado por día (la mayoría de los cuales son de origen bovino), la generación de aguas residuales en un volumen promedio de 4.838,4 litros por día. En cuanto a los parámetros físico-químicos, la Administración señala que los residuos sólidos del matadero y sólidos en suspensión son propensos a estar dentro de los límites permitidos por la ley. Dado que, sin embargo, la gestión de los residuos no se comprueba en el camal de Cayambe se generan fuentes de contaminación para las personas que se encuentran en esa zona. Se está tratando de implementar mejoras en la gestión de residuos a través de la difusión de las normas correctas de eliminación. La disposición final de

los residuos como mencionamos antes no se encuentra controlada, se desechan los residuos a las vertientes y ríos cercanos al sector.

Impacto ambiental

El camal de Cayambe produce una alta contaminación y los residuos de sí mismos, y la eliminación inadecuada de los subproductos, como la sangre (bovina 3170 lt/día, porcina 264 lt/día y ovina 77.7 lt/día), rumen (bovina 24180 kg/día), estiércol (bovina 5175 kg/día, ovina 111 kg/día, porcina 432 kg/día) y desechos. También se presentan técnicas de manejo inadecuadas para la carne después del proceso de faenamiento. La disposición final es la misma que los residuos de la bilis.

3.1.8.1. Proceso de faenamiento en el camal de Cayambe

Esencialmente se trabaja de manera similar con variaciones en algunos pasos:

- No se somete a los animales a ayuno previo.
- El pelado se hace de manera manual
- En Cayambe hay un área de refrigeración post mortem.
- Igualmente las vísceras se recogen en recipientes plásticos y son vendidas a consumidores locales, la bilis se vende para la producción artesanal o casera de shampoo.

3.1.9. Camal Metropolitano de Quito

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Ubicación: Barrio Sur en el Ecuador de la Ciudad de Quito

Gestionado por la Sociedad del camal Metropolitano de Quito funciona de acuerdo con las normas técnicas y de salud, de acuerdo con las leyes y reglamentos para proporcionar productos manipulados higiénicamente, no aptos para el consumo humano preservando el medio ambiente. Las ventas son controlada con el fin de

regular y controlar el funcionamiento de los camales, se han establecido instituciones llamadas " carnes terceras " para garantizar que los ciudadanos del Distrito Metropolitano de Quito productos de calidad. En este faenamamiento se limitan a la admisión y residencia de ganado vacuno, porcino y ovino, así como las áreas de lavado y almacenamiento de desechos.

El camal Metropolitano de Quito ofrece el servicio de transporte de la carne y de los intestinos después de la normativa vigente:

- Las leyes y reglamentos de faenamamiento
- Regulación de BPM (Buenas Prácticas de Manufactura)
- Decisión 197 (Ley 197) - Legislación subandina JUNAC
- Código de Salud
- Interna regulaciones EMRQ

El camal da cuenta de control fitosanitario de los animales antes de ser sacrificados de acuerdo a las normas establecidas por el Ministerio de Agricultura del Ecuador. También lleva a cabo controles en las granjas. Siguen procedimientos, instrucciones y manuales que cumplan con los requisitos de salud en cada área y en cada sector.

Cada día se comprueba la sanidad vegetal y control veterinario de los animales.

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

- Carnol: se encuentra en la esquina noroeste de Calacalí, donde se fijará el nuevo camal, que será gestionado a nivel local, si es posible.
- Carne Agroindustrias del Norte: situado en la zona de Llano Grande, no presenta un adecuado control ambiental, pero también es supervisado por el sector privado del Camal Metropolitano de Quito.
- Becerro Masacre: situado en la zona de Calderón, es un camal privado controlado por el distrito metropolitano.
- Masacre Quinche: en el lado opuesto del valle de Tumbaco.
- Matadero Pintag: en el lado opuesto del Camal de Quito, en el sur de la ciudad hacia el Valle de los Chillos.

- Matadero Conocoto: se ejecuta en la misma posición del año anterior.

Tratamiento de residuos

Desde 2007 el Camal metropolitano tiene un biodigestor y por lo tanto es capaz generar productos para la nutrición equilibrada de los animales y fertilizantes orgánicos para enriquecer los suelos. La capacidad de procesamiento es de 6.000 litros de sangre por día, el mismo que es obtenido en el proceso de sacrificio de las tres líneas de ganado: ganado vacuno, cerdos y ovejas. Se obtiene un promedio de 9,7 litros/día por bovino, 2,5 litros/día por cada porcino y 1,5/día por cada ovino, recalcando que la única sangre que sirve para la industria de harinas es la de bovino y el resto de sangre se la ocupa en restaurantes y en embutidoras.

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

Gestión de la bilis

En el Camal de Quito se obtienen 208 litros a la semana de bilis. Se vende a \$ 130 por 55 galones. Producen alrededor de 397 galones al mes. El Camal produce 400-500 g por cada año de cálculos biliares que se venden a un precio de 12 dólares por gramo en las empresas coreanas y colombianas. La venta de bilis y cálculos biliares crea un mercado de alrededor de \$ 10.000 por año.

Impacto ambiental

Uno de los mayores problemas del Camal Metropolitano de Quito es el tratamiento de las aguas residuales. Dada la gran cantidad de residuos vertida en estas aguas, se produce un olor acre y nauseabundo que resulta en el aumento de las moscas, todo en una zona donde se vende el producto de alimentación local. A nivel nacional, hay muchos defectos en cuanto a la utilización, el transporte y el manejo del ganado. Otras dificultades se refieren a las instalaciones y equipos del faenamiento, así como las condiciones sanitarias no son adecuadas. El proceso de masacre es muy

heterogéneo en el Ecuador y el Camal de Quito metropolitano resulta ser el mayor instituto tecnológico. Por supuesto, todos los días te encuentras con problemas debido a los intentos de mejorar los servicios en el cantón de Quito.

Tratamiento de las aguas residuales

La planta de tratamiento trabaja las 24 horas del día, los siete días de la semana y esta operada por la EMAPS (Empresa Pública Metropolitana de Alcantarillado, Agua y Saneamiento) procesan 450 metro cúbicos de aguas residuales, entre estas:

- Aguas rojas: son del proceso de matanza
- Aguas verdes: de las vísceras

Control ambiental

La empresa está controlada por el Ministerio de Salud Pública, Ministerio de Agricultura y Ganadería (Agrocalidad), Ministerio del Ambiente y Concejo Provincial son los entes que controlan el tema ambiental de la empresa y la Secretaria Metropolitana de Ambiente.

En el año del 2012 hasta el mes de abril la EMRAQ EP (Empresa Metropolitana de Rastro Quito Empresa Pública) mantuvo vigente el Certificado Ambiental concedido por la Secretaria Metropolitana de Ambiente. Actualmente no cuentan con licencia ambiental porque empieza a tomar partido el Ministerio del Ambiente, se encuentran en trámite con contratos preliminares que tienen un costo de \$ 50 mil dólares y solo será la auditoría de inicio, la empresa que gano el concurso para realizar la auditoría ambiental fue COSTECAM, quienes están realizando el estudio de impacto ambiental del Cama Metropolitano de Quito y de los Camales rurales del Quinche y Pintag.

3.2. Tablas de resultados

Resultados preliminares de la capacidad biotransformadora de bacterias:

Tabla 6. Detección de bacterias biotransformadoras

Bacterias	Ácido hyodesoxicólico	Ácido desoxicólico
MM B2	X	X
MM B3	--	--
MM B4	X	X
MM B5	X	X
MM B6	--	X
MM B7	X	X
MM B8	--	X
MM B9	X	X
MM B11	--	--
MM B12	--	--
MM B13	X	X
MM B14	X	X
MM B15	X	X
MM B16	--	X
MM B17	X	X
MM B18	--	X
MM B19	X	X
MM B20	X	X
MM B21	X	X
MM B22	--	X
MM B23	--	--
MM B24	--	--
MM B25	X	--
MM B26	X	X
MM B27	X	--
MM B28	--	--
MM B29	--	--
MM B30	--	X
MM B31	--	--
MM B32	X	X
MM B33	--	X
MM B34	--	--
MM B35	X	--
MM B36	X	X
MM B37	--	--
MM B38	X	--
MM B39	X	--
MM B40	X	--
MM B41	X	--
MM B42	X	X
MM B43	X	--
MM B44	X	0

Bacterias	Ácido hyodesoxicólico	Ácido desoxicólico
MM B45	X	X
MM B46	--	X
MM B47	--	--
MM B48	X	X
MM B50	0	X
MM B51	--	--
MM B52	--	X
MM B53	--	--
MM B54	X	X
MM B55	X	X
MM B56	X	X
MM B57	X	X
MM B58	X	--
MM B59	X	X
MM B60	X	--
MM B61	--	--
MM B62	X	--
MM B63	X	--
MM B64	X	--
MM B65	X	X
MM B66	X	X
MM B67	X	X
MM B68	X	X
MM B69	X	X

(X) Biotransforma

(--) No Biotransforma

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

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: a partir de los resultados preliminares se puede observar un grupo representativo de bacterias con capacidad de biotransformar. A su vez observamos dos bacterias que utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono. Este proceso puede generar otro tipo de investigación que ayude a identificar cual sería el mejor proceso de biotransformación para estas bacterias.

Resultados preliminares de la capacidad biotransformadora de hongos:

Tabla 7. Detección de hongos biotransformadores

Hongos	Ácido hyodesoxicólico	Ácido desoxicólico
MM F1	X	0
MM F2	0	--
MM F3		X
MM F4	--	--
MM F5		--
MM F6	--	X
MM F7		--
MM F8	--	--
MM F9	--	X
MM F10		--
MM F11	X	X
MM F12	X	X
MM F13	--	X
MM F14	--	X
MM F15	X	X
MM F16	--	X
MM F17	X	--
MM F18	0	--
MM F19	X	--
MM F20	--	X
MM F21	--	--
MM F22	--	--
MM F23	--	0
MM F24	--	--
MM F25	--	--
MM F26	--	--
MM F27	--	--

(X) Biotransforma

(--) No Biotransforma

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

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: a partir de los resultados preliminares se puede observar un grupo representativo de hongos con capacidad de Biotransformación. A su vez observamos cuatro hongos que utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono. Este proceso puede generar otro tipo de investigación que ayude a identificar cual sería el mejor proceso de biotransformación para estos hongos

3.2.1. Biotransformación de bacterias

Tabla 8. Resultado de biotransformación de bacterias (Ácido hyodesoxicólico y desoxicólico)

CÓDIGO	ÁCIDO HYODESOXICÓLICO	ÁCIDO DESOXICÓLICO
	24/48 HORAS	24/48 HORAS
MM B25	BIOTRASNFORMA	--
MM B26	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B27	BIOTRASNFORMA	-
MM B30	--	BIOTRANSFORMA
MM B31	--	--
MM B32	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B33	-	BIOTRANSFORMA
MM B35	BIOTRANSFORMA	--
MM B36	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B38	BIOTRANSFORMA	--
MM B39	BIOTRANSFORMA	--
MM B40	BIOTRANSFORMA	--
MM B41	BIOTRANSFORMA	--
MM B42	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B43	BIOTRANSFORMA	--
MM B44	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B45	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B46	--	BIOTRANSFORMA
MM B48	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B50	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B52	--	BIOTRANSFORMA
MM B54	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B55	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B56	BIOTRANSFORMA	--
MM B57	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B58	BIOTRANSFORMA	--
MM B59	--	BIOTRANSFORMA
MM B60	BIOTRANSFORMA	--
MM B62	BIOTRANSFORMA	--
MM B63	BIOTRANSFORMA	--
MM B64	BIOTRANSFORMA	--
MM B65	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B66	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B67	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B68	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA
MM B69	BIOTRANSFORMA	BIOTRANSFORMA

(--) No Biotransforma

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: las bacterias más representativas dentro de la investigación presentan capacidad de biotransformación a las 24 y 48 horas, a partir de estos resultados se continuó con el escalamiento bacteriano para extraer la fase orgánica producida por estos microorganismos.

3.2.3. Biotransformación de hongos

Ácido hyodesoxicólico

Tabla 9. Resultado de biotransformación de hongos (Ácido hyodesoxicólico)

CÓDIGO	# HORAS DE BIOTRANSFORMACIÓN
MM F11	96 HORAS
MM F12	120 HORAS
MM F15	96 HORA
MM F17	24 HORAS
MM F19	72 HORAS

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: después de realizar el análisis de los hongos objetos de estudio se pudo evidenciar que se presentan cinco hongos con capacidad de biotransformación, se señala que la capacidad de biotransformación es menor al de las bacterias esto puede ser debido a la capacidad de adaptación que presentan estos microorganismos.

Ácido desoxicólico

Tabla 10. Resultado de biotransformación de hongos (Ácido desoxicólico)

CÓDIGO	# HORAS DE BIOTRANSFORMACIÓN
MM F11	96 HORAS
MM F12	144 HORAS
MM F13	144 HORAS
MM F14	120 HORAS
MM F15	96 HORAS
MM F16	144 HORAS

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: después de realizar el análisis de los hongos objetos de estudio se pudo evidenciar que se presentan seis hongos con capacidad de biotransformación, se señala que la capacidad de biotransformación es menor al de las bacterias esto puede ser debido a la capacidad de adaptación que presentan estos microorganismos.

3.2.4. Porcentaje de Biotransformación del ácido hyodesoxicólico

Tabla 11. Porcentaje de biotransformación de bacterias según TLC (Ácido hyodesoxicólico)

Bacteria	Tiempo	Acido 3-ceto hyodesoxicólico
MM B25	48 horas	80%
MM B26	48 horas	(0)
MM B29	48 horas	50%
MM B30	48 horas	65%
MM B35	48 horas	80%
MM B36	48 horas	75%
MM B37	48 horas	50%
MM B38	48 horas	85%
MM B39	48 horas	50%
MM B40	48 horas	60%
MM B41	48 horas	70%
MM B44	48 horas	80%
MM B48	48 horas	50%
MM B50	48 horas	(0)
MM B54	48 horas	75%
MM B64	48 horas	50%
MM B66	48 horas	80%
MM B67	48 horas	80%
MM B68	48 horas	70%
MM B69	48 horas	80%

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

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

Discusión: dentro de los resultados obtenidos mencionamos en la tabla las bacterias que presentan un porcentaje de biotransformación mayor al 50% por presentar una mayor eficiencia en este proceso y ser los más representativos dentro de la investigación.

Tabla 12. Porcentaje de biotransformación de hongos según TLC (Ácido hyodesoxicólico)

Hongos	Tiempo	Acido 3-ceto hyodesoxicólico
MM F12	120 horas	10%
MM F15	120 horas	(0)

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

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

3.2.5. Porcentaje de Biotransformación del ácido desoxicólico

Tabla 13. Porcentaje de biotransformación de bacterias según TLC (Ácido desoxicólico)

Bacteria	Tiempo	Acido 3-ceto hyodesoxicólico
MM B26	48 horas	100%
MM B30	48 horas	100%
MM B33	48 horas	(0)
MM B36	48 horas	100%
MM B42	48 horas	80%
MM B44	48 horas	(0)
MM B45	48 horas	(0)
MM B46	48 horas	70%
MM B48	48 horas	50%
MM B50	48 horas	100%

MM B54	48 horas	80%
MM B55	48 horas	80%
MM B57	48 horas	100%
MM B66	48 horas	100%
MM B67	48 horas	100%
MM B68	48 horas	80%
MM B69	48 horas	75%

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

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

Discusión: dentro de los resultados obtenidos mencionamos en la tabla las bacterias que presentan un porcentaje de biotransformación mayor al 50% por presentar una mayor eficiencia en este proceso y ser los más representativos dentro de la investigación.

3.2.6. Escalamiento de microorganismos

3.2.6.1. Ácido hyodesoxicólico

Bacterias

- **EB MM 38 (anexo 1):** Se escogió esta bacteria al presentar biotransformación a las 24 y 48 horas con la fase móvil uno 50:2 (50ml de acetato de etilo y 2ml de ácido glacial acético) y estándar con oxidado en tres (estándar extraído de la biotransformación de la *Pseudomona paucimobilis*), como podemos observar se presenta una biotransformación bien diferenciada al mismo nivel del estándar con el oxidado en tres a las 24 y a las 48 horas, vemos como el producto de biotransformación solo se presenta en el oxidado en tres.
- **EB MM 26 (anexo 2):** Se realizó el monitoreo de esta bacteria con fase móvil 2 70:30:2 (70ml acetato de etilo, 30 ml hexano, 2ml de ácido glacial acético). Se puede observar que a las 24 horas presenta biotransformación

bien definida con una mancha arriba del estándar y a las 48 horas que el microorganismo metaboliza toda la sal del ácido biliar.

- **EB MM 35 (anexo 3):** Se realizó el monitoreo de esta bacteria con fase móvil dos 70:30:2, podemos observar que a las 24 horas presenta biotransformación sobre el estándar y a las 48 horas la biotransformación se presenta un poco más arriba, la bacteria presenta un biotransformación bien pronunciada tanto a las 24h como a las 48h.

Hongos

- **EF MM 12 (anexo 4):** Se realizó el monitoreo del hongo con fase móvil dos y con el estándar oxidado en tres (estándar extraído de la biotransformación de la *Pseudomona paucimobilis*), este no presento biotransformación en los primeros cinco días. Presenta biotransformación a los 7 días, podemos observar una pequeña mancha arriba del estándar cerca del oxidado en tres, la mancha no se presenta tan pronunciada.
- **EF MM 15 (anexo 5):** Se realizó el monitoreo del hongo con fase móvil dos y con el estándar oxidado en tres, este no presento biotransformación en los primeros cinco días. Presenta biotransformación a los 7 días, podemos observar manchas de la biotransformación cerca del estándar del oxidado en tres, se observa una mancha tenue de biotransformación.

3.2.6.2. Ácido desoxicólico

Bacterias

- **EB MM 66 (anexo 6):** se escogió esta bacteria para realizar el cultivo preparativo, ya que en la TLC, muestra una biotransformación de ácido Desoxicólico, oxidado en tres (estándar extraído de la biotransformación de la *Pseudomona paucimobilis*), ya que se observa la mancha de oxidación junto al estándar.
- **EB MM 67 (anexo 7):** al realizar el monitoreo con el estándar del oxidado en tres se pudo observar una biotransformación muy significativa al mismo nivel del estándar, por lo que se concluye que esta bacteria presenta un proceso de biotransformación.
- **EB MM 26 (anexo 8):** presenta una mancha al mismo nivel del estándar y otra que podría ser analizada y tomada como producto de interés.

- **EB MM 42 (anexo 9):** se observa una biotransformación casi completa de ácido Desoxicólico, es decir que el producto de biotransformación presenta un cambio significativo en su estructura química, lo que se corrobora posteriormente con RMN.

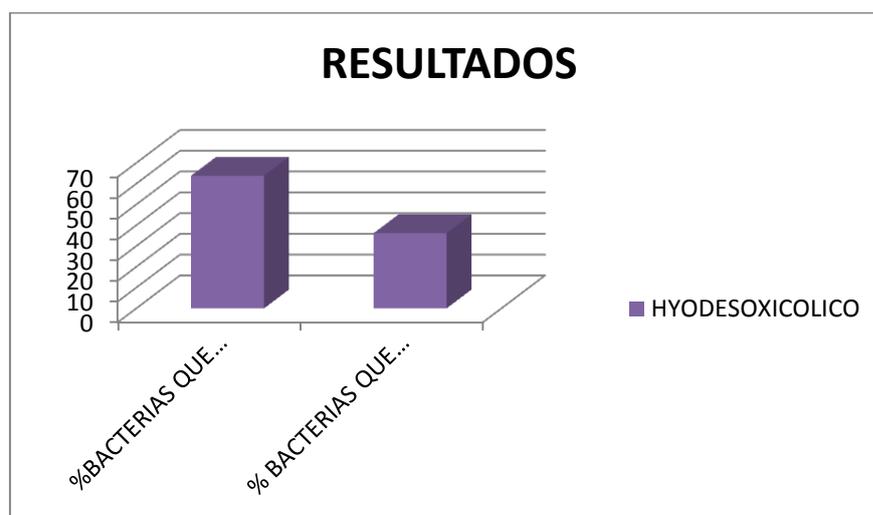
3.3 Análisis del potencial de biotransformación

De un total de 47 bacterias evaluadas con los ácidos biliares hyodesoxicólico y desoxicólico respectivamente, se encontraron 31 bacterias capaces de biotransformar ácido hyodesoxicólico y 21 bacterias capaces de biotransformar ácido desoxicólico.

De un total de 30 hongos evaluados con el ácido biliar hyodesoxicólico y desoxicólico respectivamente, se encontraron 2 hongos capaces de biotransformar ácido hyodesoxicólico y 0 hongos capaces de biotransformar ácido desoxicólico.

Bacterias

Figura N°16. Porcentaje de la capacidad de biotransformación del ácido biliar hyodesoxicólico de las bacterias aisladas



Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: de un total de 31 bacterias con capacidad de biotransformación el 6,45% (2 bacterias) desaparecen porque utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.

Tabla 14. Número de cepas de bacterias aisladas con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico

Nº DE CEPAS AISLADAS	RANGO DE PORCENTAJE DE BIOTRANSFORMACIÓN
10	50-75%
7	75-100%

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: Las bacterias más representativas según su capacidad biotransformadora son las que se encuentran en el rango de 75-100% por presentar una alta capacidad de biotransformación, pudiendo encontrar a 7 bacterias dentro de este grupo, que representan el 14,89% del total de bacterias evaluadas.

Hongos

Figura N°17. Porcentaje de la capacidad de biotransformación del ácido biliar hyodesoxicólico de los hongos aislados



Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Tabla 15. Número de cepas de hongos aislados con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico

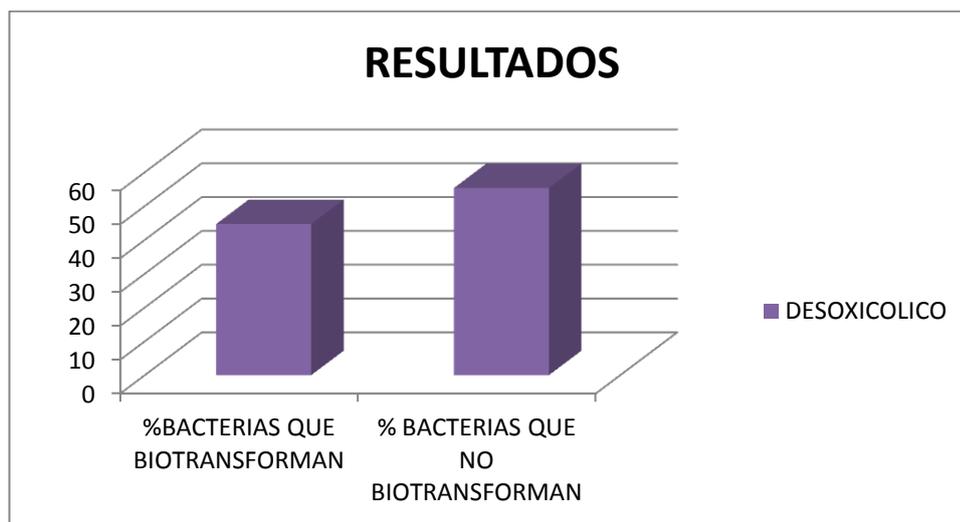
Nº DE CEPAS AISLADAS	RANGO DE PORCENTAJE DE BIOTRANSFORMACIÓN
2	0-25 %
0	25-50%

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: Lo hongos presentan capacidad de biotransformación en el rango de 0-25%, encontrado dos hongos con una mínima capacidad de biotransformación para el ácido hyodesoxicólico.

Bacterias

Figura N° 18. Porcentaje de la capacidad de biotransformación del ácido biliar desoxicólico de las bacterias aisladas



Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: de un total de 21 bacterias con capacidad de biotransformación el 14,28% (3 bacterias) desaparecen porque utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.

Tabla 16. Número de cepas de bacterias aisladas con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido desoxicólico

Nº DE CEPAS AISLADAS	RANGO DE PORCENTAJE DE BIOTRANSFORMACIÓN
3	50-75%
11	75-100%

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: Las bacterias más representativas según su capacidad biotransformadora son las que se encuentran en el rango de 75-100% por presentar una alta capacidad de biotransformación, pudiendo encontrar a 11 bacterias dentro de este grupo, que representan el 52,38% del total de bacterias evaluadas.

3.4 Identificación de las bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico

Tabla 17. Bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido hyodesoxicólico

CÓDIGO	ESPECIE	CERTEZA DE IDENTIFICACIÓN
MM B39	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	100%
MM B40	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	87,36%
MM B36	<i>Vibrio alginolyticus</i>	97,35%

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

Discusión: dentro de la identificación de las bacterias con mayor eficiencia de biotransformación del ácido hyodesoxicólico, también se selecciona a la bacteria MM B38, pero está en las pruebas de identificación presentaba una certeza de identificación del 0.01%, por lo tanto se debería realizar otro tipo de prueba de identificación para poder llegar a conocer la especie de dicha bacteria.

3.4.1 Características de las bacterias identificadas

Burkholderia pseudomallei **Familia:** *Pseudomonaceae*

La *Burkholderia pseudomallei* es un bacilo Gram negativo, no fermentador, móvil, aerobio estricto, no formador de esporas y que puede presentar una tinción bipolar. Es oxidasa positivo, crecen a 42° C, reduce los nitritos e hidroliza la gelatina. Sus colonias son secas arrugadas y con mal olor y éste varía desde putrefacto hasta el olor de la tierra mojada. Este organismo es el agente causal de melioidosis y es adquirido o por inhalación o por el contacto de una lesión en la piel con tierra o con agua contaminada. (Villegas, Herrera, & Vargas, 1998)

Esta bacteria presenta un porcentaje del 50% de capacidad de biotransformación por lo cual se realizó la identificación del género del microorganismo. No se conocen estudios relacionados con el tema de investigación, por lo que este sería el primero en cuanto a procesos de biotransformación.

Vibrio parahaemolyticus **Familia:** *Vibrionaceae*

Los vibrios son bacilos gram negativos, móviles, tolerantes a la sal y anaerobios facultativos. Las especies que se asocian a diarrea son el vibrio parahaemolyticus, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluviales* y *V. frunci*. Por su parte, el *V. vulnificus* causa septicemia e infección de heridas en pacientes inmunodeprimidos. (Silva, 2007)

Esta bacteria presenta un porcentaje del 60% de capacidad biotransformadora por lo cual se identificó el género del microorganismo. No se conocen estudios relacionados con el tema de investigación, por lo que este sería el primero en cuanto a procesos de biotransformación.

Vibrio alginolyticus **Familia:** *Vibrionaceae*

Es un bacilo corto curvo o recto, Gram negativo, quimiorganotrofico, móvil por flagelos peritricos y polares. Pertenece a la familia Vibrionacea y al género Vibrio, de este grupo *Vibrio alginolyticus* es el más halofílico de todos ya que es capaz de crecer en concentraciones de 3, 6, 8 y hasta 10% de NaCl. Se aísla con frecuencia de aguas costeras templadas y tropicales, especialmente en cuando la temperatura del agua es superior a los 17°C. (Silva, 2007)

Esta bacteria presenta un porcentaje del 75% de capacidad biotransformadora por lo cual se identificó el género del microorganismo. No se conocen estudios relacionados con el tema de investigación, por lo que este sería el primero en cuanto a procesos de biotransformación.

Discusión: a pesar de realizar las pruebas bioquímicas de identificación de la bacteria EM B38, no se logró identificarla, por lo que se recomienda realizar otro tipo de pruebas de identificación de especie, ya que esta bacteria presenta un 85% de capacidad de biotransformación considerándose de alta eficiencia.

3.5 Identificación de las bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido desoxicólico

Tabla 18. Bacterias con mayor eficiencia en la biotransformación del ácido desoxicólico

CÓDIGO	ESPECIE	CERTEZA DE IDENTIFICACIÓN
MM B66	<i>Pasteurella multocida</i>	93,67%

MM B48	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	100%
MM B67	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,27%
EM B26	<i>Proteus penneri</i>	94,46%

Elaborado por: Misheel Araujo y Andrea Ruíz

3.5.1 Características de las bacterias identificadas

Pasteurella multocida **Familia:** *Pasteurellaceae*

Es un cocobacilo pleomórfico gramnegativo. En la tinción de Gram puede observarse como formas cocoides o como bacilos cortos o filamentosos, con una típica tinción bipolar, que pueden aparecer sueltos o agrupados en parejas o cadenas cortas. (Silva, 2007)

Esta bacteria presenta un porcentaje del 100% de capacidad biotransformadora por lo cual se identificó el género del microorganismo. No se conocen estudios relacionados con el tema de investigación, por lo que este sería el primero en cuanto a procesos de biotransformación.

Pseudomonas aeruginosa **Familia:** *Pseudomonaceae*

Es una bacteria flagelada con forma de bastoncillo, que produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro. Es una bacteria muy extendida, y puede encontrarse en el agua, la tierra, animales o plantas, ya que sus necesidades alimenticias son mínimas, aunque las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos. En los seres humanos puede encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano. (Tapia, 2006)

Esta bacteria presenta un porcentaje del 100% de capacidad biotransformadora por lo cual se identificó el género del microorganismo. No se conocen estudios relacionados con el tema de investigación, por lo que este sería el primero en cuanto a procesos de biotransformación.

Proteus penneri **Familia:** *Enterobacteriaceae*

Se describen como bacilos gramnegativos, móviles, con flagelos peritricos, aerobios y anaerobios facultativos. Todos ellos, y debido a la producción de fenilalanina desaminasa, se caracterizan por su capacidad para desaminar la fenilalanina y

trasformarla en ácido fenilpirúvico; también hidrolizan la tirosina, desdoblan en casi todos los casos la urea y son resistentes a la colistina. (Tapia, 2006)

Esta bacteria presenta un porcentaje del 100% de capacidad biotransformadora por lo cual se identificó el género del microorganismo. No se conocen estudios relacionados con el tema de investigación, por lo que este sería el primero en cuanto a procesos de biotransformación.

Burkholderia pseudomallei **Familia:** *Pseudomonaceae*

Esta bacteria presenta un porcentaje del 50% de capacidad biotransformadora por lo cual se identificó el género del microorganismo. No se conocen estudios relacionados con el tema de investigación, por lo que este sería el primero en cuanto a procesos de biotransformación.

3.6 Resultados de bacterias más eficientes muestreadas en camales

A partir de los análisis preliminares del muestreo en los camales de Cayambe y Latacunga se determinó las cepas con mayor eficiencia dependiendo del lugar de muestreo, detallándolas a continuación:

3.6.1. Zonas de muestreo con bacterias más eficientes de biotransformación del ácido hyodesoxicólico

- Paredes de la zona de mecanizado: MM B35 con el 80% de biotransformación.
- Paredes de la zona de matanza: MM B54 con el 75% de biotransformación, MM B69 con el 80% de biotransformación.
- Contenedor de los intestinos: MM B36 con el 100% de biotransformación.
- Contenido del estómago: MM B67 con el 70% de biotransformación, MM B50 utiliza todo el ácido biliar como fuente de carbono.
- Sección de recolección de ubres: MM B30 con el 50% de biotransformación.
- Paredes de la zona de mecanizado: MM B35 con el 80% de biotransformación.
- Equipo de procesamiento del animal: MM B69 con el 70% de biotransformación.

3.6.2. Zonas de muestreo con bacterias más eficientes de biotransformación del ácido desoxicólico

- Paredes de la zona de mecanizado: MM B57 con el 80% de biotransformación.
- Paredes de la zona de matanza: MM B54 con el 75% de biotransformación, MM B69 con el 80% de biotransformación.
- Contenedor de los intestinos: MM B36 con el 75% de biotransformación.
- Contenido del estómago: MM B54 con el 70% de biotransformación, MM B69 con el 75% de biotransformación, MM B33 utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.
- Sección de recolección de ubres: MM B30 con el 50% de biotransformación.
- Paredes de la zona de mecanizado: MM B35 con el 80% de biotransformación.
- Equipo de procesamiento del animal: MM B66 con el 90% biotransformación.
- Lavabo A de la piedra: MM B42 con el 82% de biotransformación.
- Vísceras del procesamiento: MM B44 y MM B45, utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.
- Vísceras de la zona de recepción: MM B68 con el 80% de biotransformación.

3.7 Resonancia magnética nuclear

Para la bacteria MM B26 con el ácido hyodesoxicólico, se logro identificar un producto obtenido de la biotransformación con la sal del ácido biliar. Pudiendo observar cambios de estructura en el compuesto esteroide, se puede ver la desaparición de la cadena lateral, oxidación del alcohol a cetona y aparición de un doble enlace en el carbono 1 y 4. (Anexo 38)

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo de investigación, las bacterias presentan un mayor porcentaje de capacidad biotransformadora en relación a los hongos. La baja capacidad biotransformadora de los hongos puede deberse a la diferencia de las rutas metabólicas que hay entre los hongos y las bacterias. Las bacterias presentan una alta capacidad biodegradativa.
- De un total de 47 bacterias evaluadas con los ácidos biliares hyodesoxicólico y Desoxicólico respectivamente, se encontraron 30 bacterias (64%) capaces de biotransformar ácido hyodesoxicólico y 21 bacterias (45%) capaces de biotransformar ácido desoxicólico.
- De las 30 bacterias con capacidad de biotransformación del ácido hyodesoxicólico existe un porcentaje del 6,45% que utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.
- Para el ácido desoxicólico existe un porcentaje del 14,98% con respecto a las 21 bacterias con capacidad de biotransformación que utilizan todo el carbono de la sal de ácido biliar como fuente de energía hasta la producción de dióxido de carbono.
- De un total de 30 hongos evaluados con el Ácido biliar hyodesoxicólico y desoxicólico respectivamente, se encontraron 2 (7%) hongos capaces de biotransformar ácido hyodesoxicólico y sobre el ácido desoxicólico no actúa ninguno.
- El mayor porcentaje de biotransformación para el ácido hyodesoxicólico es la oxidación en la posición 3, presentando las siguientes bacterias: MM B25, MM B35, MM B36, MM B38, MM B39, MM B40, MM B44, MM B66, MM B67, MM B69. con un alto porcentaje de eficiencia, se pudo identificar cuatro de las bacterias mencionadas mediante Pruebas Bioquímicas (Sistema Microgen GN-ID), ya que el kit de identificación contaba con cuatro pruebas, eligiendo las que presentaban mayor eficiencia en cuanto a la capacidad de biotransformación.

MM B36: *Vibrio alginolyticus*

MM B39: *Burkholderia pseudomallei*

MM B40: *Vibrio parahaemolyticus*

Para la bacteria MM B38, se debe realizar otro tipo de prueba de identificación, debido a que esta bacteria presenta un 85% de capacidad de biotransformación por lo que sería necesario identificar su especie.

- El mayor porcentaje de biotransformación para el ácido desoxicólico, es la oxidación en la posición 3, presentando las siguientes bacterias: MM B26, MM B42, MM B35, MM B48, MM B54, MM B57, MM B66, MM B67, MM B68, MM B69, 40 con un alto porcentaje de eficiencia. Se pudo identificar cuatro de las bacterias mencionadas mediante Pruebas Bioquímicas (Sistema Microgen GN-ID), ya que el kit de identificación contaba con cuatro pruebas, eligiendo las que presentaban mayor eficiencia en cuanto a la capacidad de biotransformación.

MM B26: *Proteus penneri*

MM B48: *Burkholderia pseudomallei*

MM B66: *Pasteurella multocida*

MM B67: *Pseudomonas aeruginosa*

Estos microorganismos presentan características patógenas. En especial se conocen estudios de *Proteus penneri* por su capacidad de intervenir en la producción de ácidos de estruvita. No se conocen estudios relacionados directamente con la capacidad de biotransformación de los Ácidos Biliares.

- De las observaciones en cromatografía en capa fina se comprobó que la oxidación en tres es la que se presenta en mayor porcentaje (70%).
- Del muestreo realizado en los camales se pudo identificar que la mejor fuente de obtención es del contenedor de intestinos para bacterias con capacidad de biotransformación el ácido hyodesoxicólico con un 100% de eficiencia. Para el ácido desoxicólico la mejor zona de muestreo fue el área de faenamiento de los animales, presentando bacterias con capacidad de biotransformación con un 80% de eficiencia.
- De la situación de los camales en el Ecuador se pudo determinar que los mejores lugares de muestreo son los camales de Latacunga y Cayambe, debido a sus condiciones ambientales críticas, siendo una gran fuente de obtención de microorganismos con capacidad de biotransformación.

- De la resonancia magnética nuclear para la bacteria MM B26 con capacidad de biotransformar el ácido hyodesoxicólico, en los cambios de estructura en el compuesto esteroide se puede ver la desaparición de la cadena lateral, oxidación del alcohol a cetona y aparición de un doble enlace en el carbono 1 y 4.
- De la revisión bibliográfica de estos microorganismos, en las bases de datos a las que se tiene acceso en la UPS, no presentan estudios sobre biotransformación de Ácidos Biliares; por lo que, éste sería el primer trabajo de investigación en el que se reporta esta actividad para las bacterias antes señaladas.

RECOMENDACIONES

- Dentro de la investigación se pueden presentar casos en donde se da el efecto de una biotransformación de los componentes del medio, se debe tener claro que si el microorganismo no biotransforma el ácido biliar, su única fuente de nutrición es el medio de cultivo, y pueden observarse manchas en las TLC (Cromatografía en Capa Fina) que nos harían pensar en nuevas rutas de biotransformación que son desvirtuadas mediante análisis más profundos como usando RNM (Resonancia Magnética Nuclear) esto es debido a la capacidad de adaptación del microorganismo. Cabe señalar que los medios utilizados son mínimos, es decir que tienen nutrientes en mínimas cantidades para que el microorganismo puede alimentarse de las sales biliares que se les dan como fuente de carbono.
- En el caso de los microorganismos que biotransforman los Ácidos Biliares hasta la producción de dióxido de carbono, se deberá identificar técnicas adecuadas para poner a prueba al microorganismo para poder identificar los pasos intermedios del proceso, una de estas puede ser saturando al microorganismo con la sal biliar.
- Dentro de la investigación nos vimos limitados solamente al uso de Kits, debido a esto no se logró la identificación de la bacteria EB MM 38. Se recomienda implementar técnicas más avanzadas de investigación, por lo que sería importante contactar con centros especializados de identificación de microorganismos e implementar las bibliotecas científicas a las que los estudiantes de la UPS tienen acceso. A futuro se deberá apoyar las técnicas de asilamiento en pruebas de evaluación enzimática, que permitirán identificar nuevas rutas de metabolismo para obtener mayor eficiencia en los procesos de biotransformación.
- El presente trabajo aporta con la implementación de una nueva línea de investigación, que sugiere aprovechar recursos presentes en el país que muchas veces son considerados como desperdicios, como los provenientes de los canales que pueden ser fuentes de microorganismos con capacidad biotransformativa de Ácidos Biliares y por ende pueden ser de interés en el campo farmacéutico, cosmético y agroalimentario.

- Se sugiere continuar con la investigación partiendo de los resultados obtenidos de la evaluación de la capacidad biotransformativa de los microorganismos.

LISTA DE REFERENCIAS

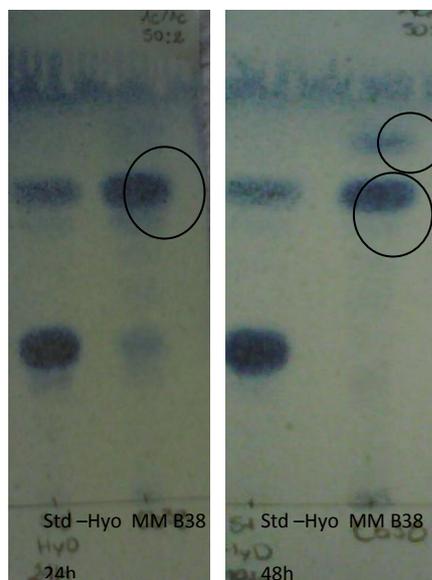
- Ahmad, S., Garg, S., & Johri, B. (1992). *Biotransformation of sterols: selective cleavage of the side chain*. Washington D.C: Biotech.
- Baldassare, F., Bertoni, G., Chiappe, C., & Marioni, F. (2000). *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 11*. USA: WILEY-VCH.
- Bravo, María. (2011). *Bacterias anaerobias, Universidad de Cauca facultad ciencias de la salud*. Recuperado el 28 de Agosto de 2013, de <http://facultadsalud.unicauca.edu.co>
- Chiang, J. (2002). Bile Acids and Nuclear Receptors Endocrine. *The Embo Journal*, 443-463.
- Difco TM. (Febrero de 2009). *Plate count broth*. Recuperado el 15 de Febrero de 2014, de <http://www.bd.com>
- Dyer, J. (2000). *Applications of Absorption Spectroscopy and Organic Compounds*. New York: Pretience-Hall.
- Fernandez, J. (1993). *Atlas de ciencias exactas, biología ácidos biliares*. Bogota: Colombia: Quinto Centenario.
- Fibao. (11 de Noviembre de 2007). *Medicina Molecular: Colesterol*. Recuperado el 3 de Julio de 2013, de <http://medmol.es>
- Guía metabólica. (2012). *Ácido desoxicólico*. Recuperado el 17 de Agosto de 2013, de <http://www.guiametabolica.org>
- Houten, S., Watanabe, S., & Auwerx, J. (2006). Endocrine fuctions of bile acids. *The EMBO Journal*, 1419-1425.
- King, M. (2013). *Síntesis y Utilización de los Ácidos Biliares*. Recuperado el 26 de Mayo de 2013, de <http://themedicalbiochemistrypage.org>

- López, José. (23 de Febrero de 2013). *Derivados del colesterol: ácidos biliares y hormonas esteroideas*. Recuperado el 15 de Jul de 2013, de <http://www.info-farmacia.com>
- Maldonado, M. (15 de Marzo de 2013). Biotransformación de ácidos biliares. *Biotransformación de ácidos biliares*. Ferrara, Italia.
- Martindale, M. (2003). *Guía completa de consulta farmacoterapéutica*. Buenos Aires: Aurora.
- Microgen. (2013). *Microgen TM GN-ID Identificación*. Recuperado el 12 de Octubre de 2013, de <http://www.medica-tec.com>
- Neogen Corporation. (Noviembre de 2010). *Sabouraud dextrosa broth*. Recuperado el 15 de Febrero de 2014, de <http://www.neogen.com>
- Plata, L. (2008). *Identificación de la flora bacteriana en cultivos de bilis de pacientes sometidos a cirugía biliar*. Recuperado el 5 de Septiembre de 2013, de <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080>
- Roda, A., Roda, E., & Hofman, A. (1999). *Acidi biliari aggiornamento per il futuro*. Barcelona: Masson.
- Santambrosio, E. (2009). *Tinción y observación de microorganismos*. Recuperado el 20 de Enero de 2014, de <http://www.frro.utn.edu.ar>
- Silva, M. (28 de Noviembre de 2007). *Mirobiología y parasitología*. Obtenido de <http://vibrioparahaemolyticusunab.blogspot.com/>
- T.R, D. (1999). *Introducción a la Química*. Mexico D.F: Cultural.
- Tapia, C. (16 de Junio de 2006). *Pseudomona aeruginosa*. Obtenido de <http://pseudomonaeruginosa.blogspot.com/>
- Villagomez, G. (2008). *Optimización cromatográfica por HPLC en la determinación de ácidos biliares*. La Paz: Bolivia: Antares.
- Villegas, I., Herrera, M., & Vargas, A. (1998). Primer aislamiento de Burkholderia pseudomallei en Costa Rica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños del Dr. Calos Sáenz Herrera*, 15-30.

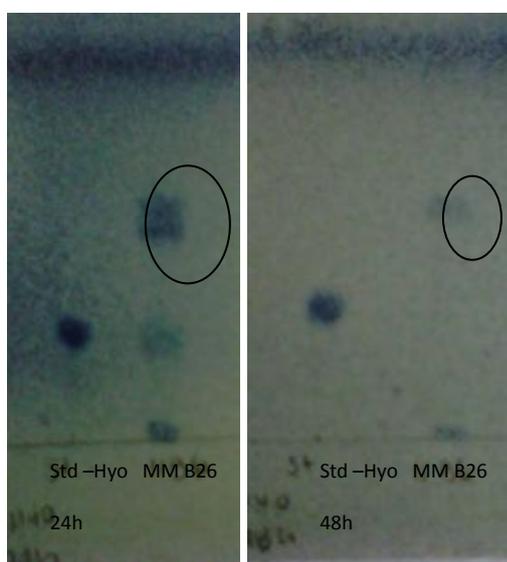
Wolkoff, A., & Cohen, D. (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: I. Hepatocyte transport of bile acid. *NCBI*, 284.

ANEXOS

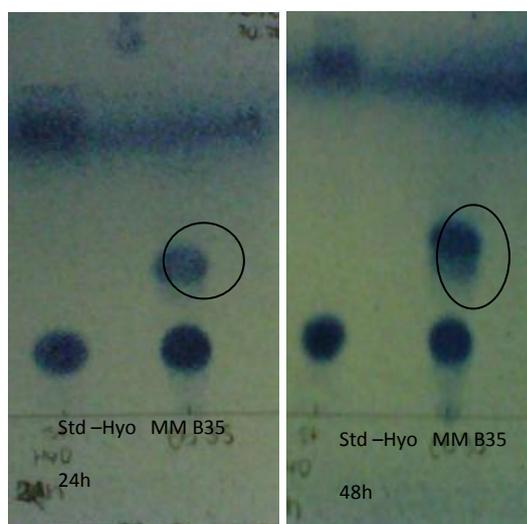
Anexo 1. TLC Bacteria MM B38, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.



Anexo 2. TLC Bacteria MM B26, Lectura a las 24 y 48 horas ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 1.



Anexo 3. TLC Bacteria MM B 35, Lectura a las 24 y 48 horas ácido hydesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.



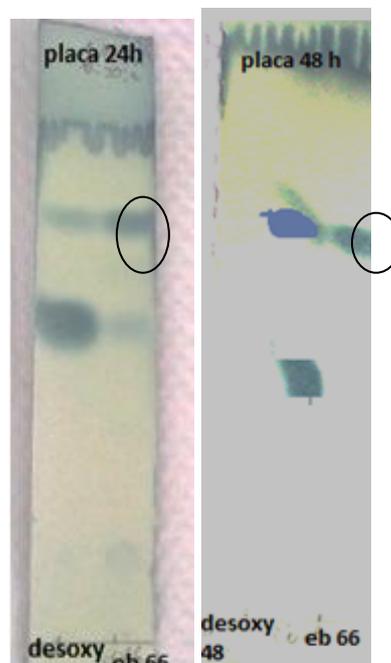
Anexo 4. TLC Hongo MM F12, este no presento biotransformación en primeros 5 días. Presenta biotransformación a 7 días. ácido hydesoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.



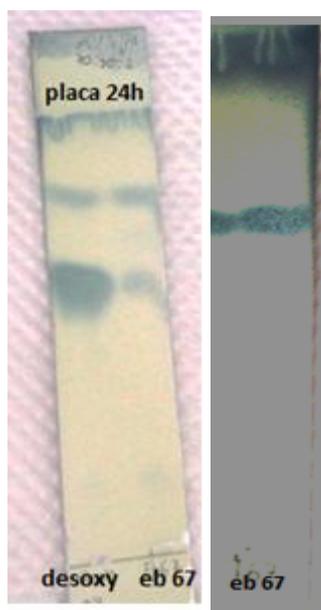
Anexo 5. TLC Hongo MM F15, este no presento biotransformación en las primeras 5 días. Presenta biotransformación a los 7 días. ácido hyodesoxicólico, cultivo preparativo.



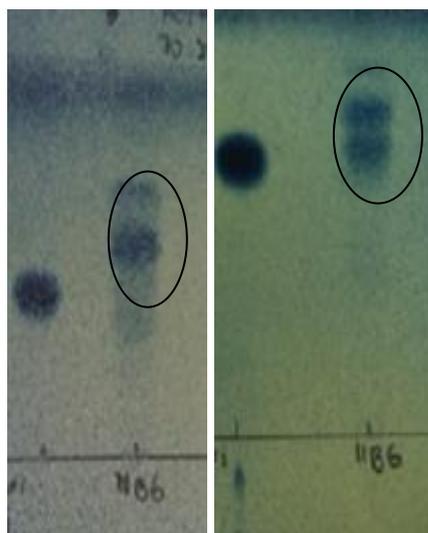
Anexo 6. TLC Bacteria MM B66, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.



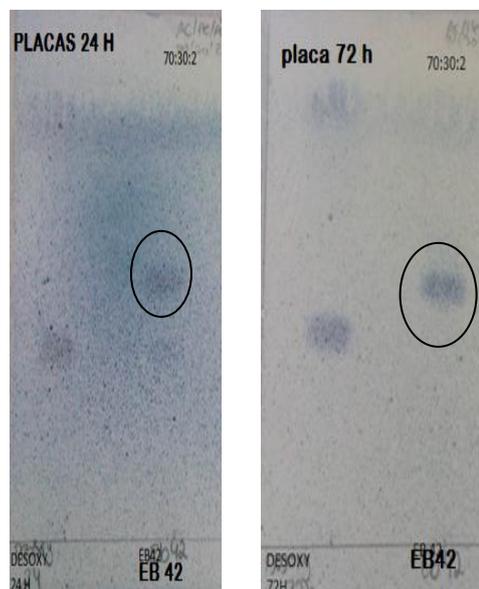
Anexo 7. TLC Bacteria MM B67, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.



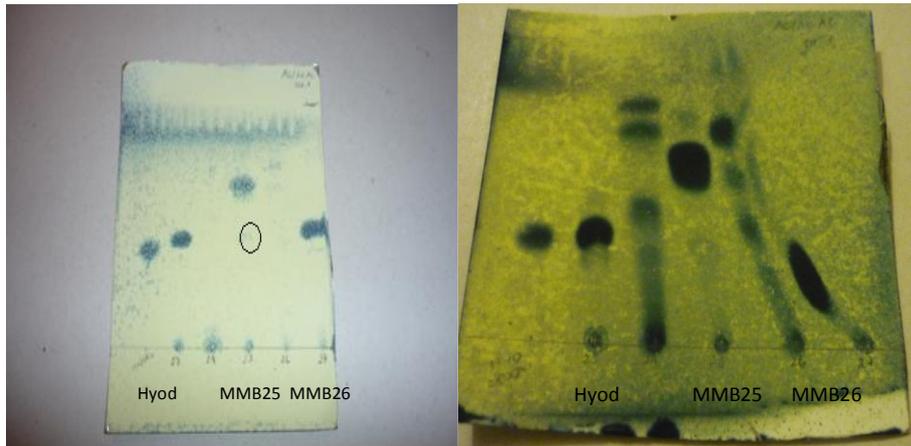
Anexo 8. TLC Bacteria MM B26, Lectura a las 24 y 48 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.



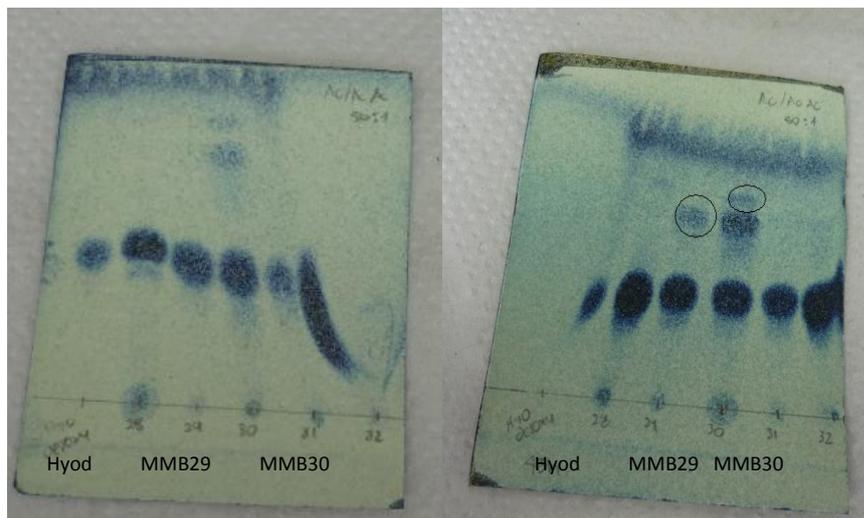
Anexo 9. TLC Bacteria EB MM 42, Lectura a las 24 y 72 horas, ácido desoxicólico, cultivo preparativo. Fase móvil 2.



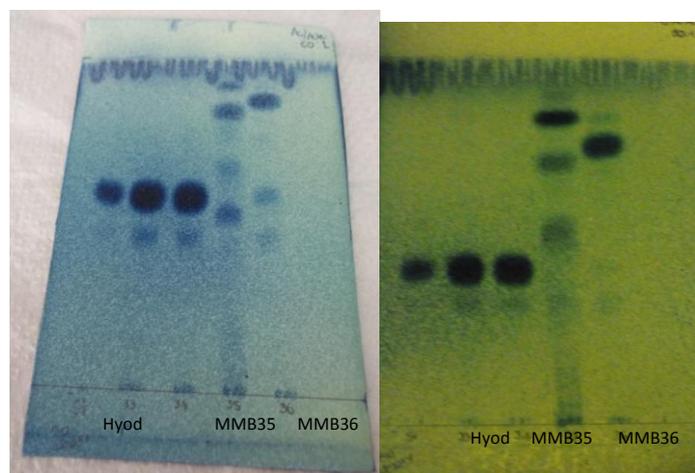
Anexo 10. Biotransformación 24 y 48 horas, bacteria MM B25, MM B26. ácido hydesoxicólico, fase móvil 1.



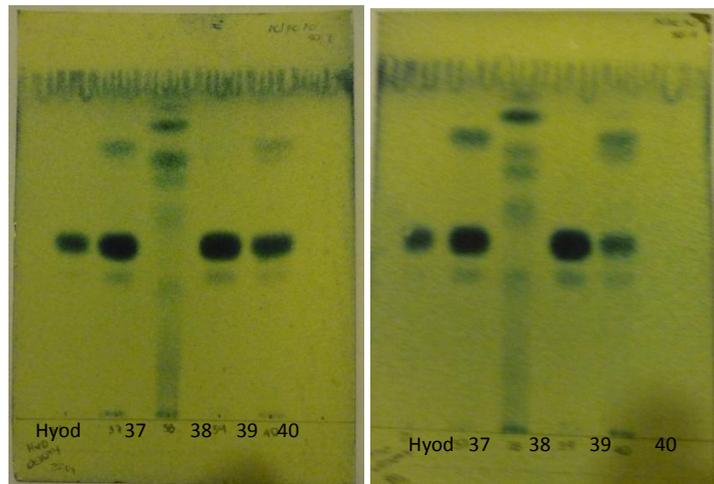
Anexo 11. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B29 y MM B30. Ácido hydesoxicólico, fase móvil 1.



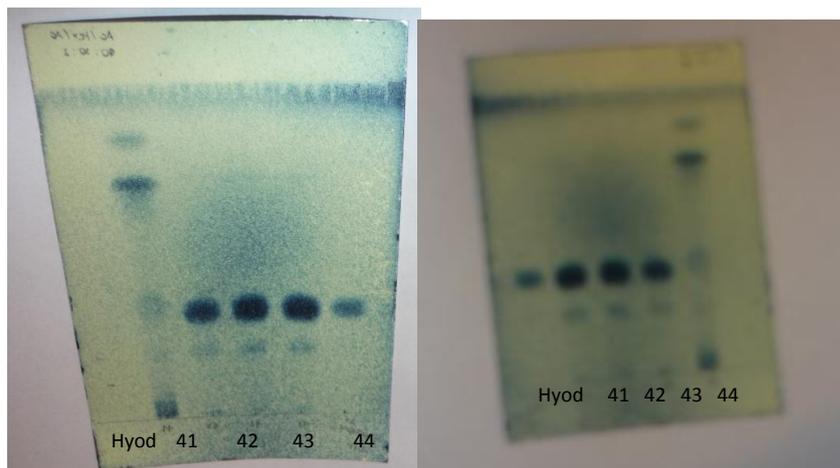
Anexo 12. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B35 y MM B36. Ácido hydesoxicólico, fase móvil 1.



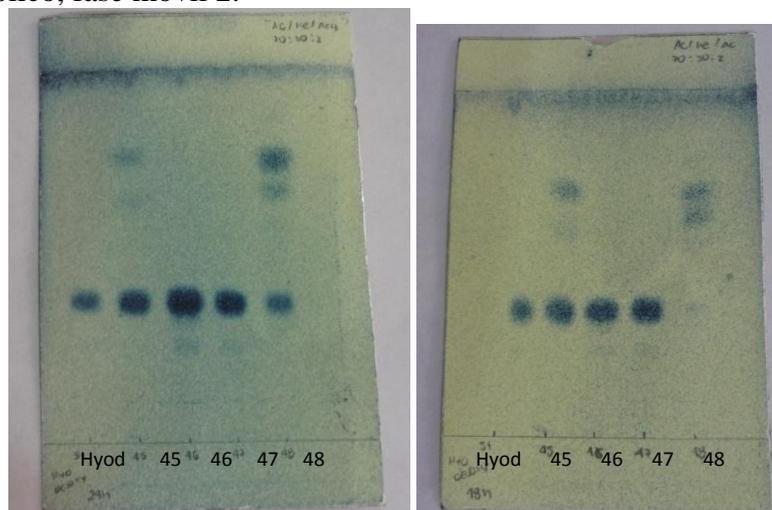
Anexo 13. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B37, MM B38, MM B39 y MM B40. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 1.



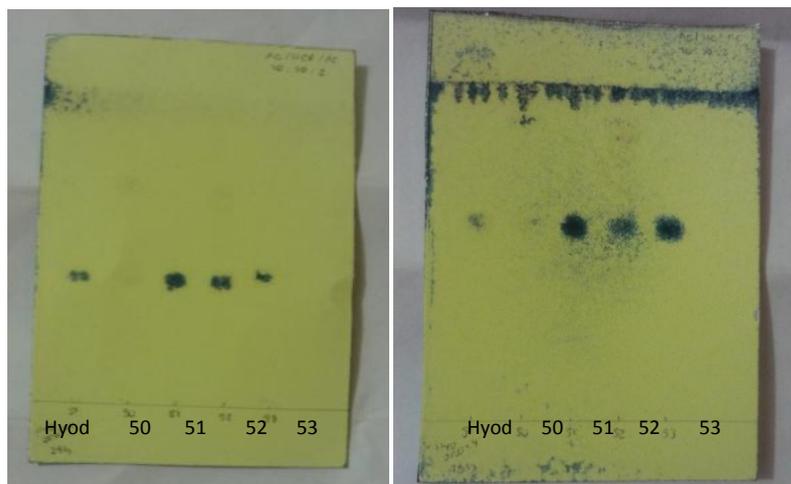
Anexo 14. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B41, MM B42, MM B43 y MM B44. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.



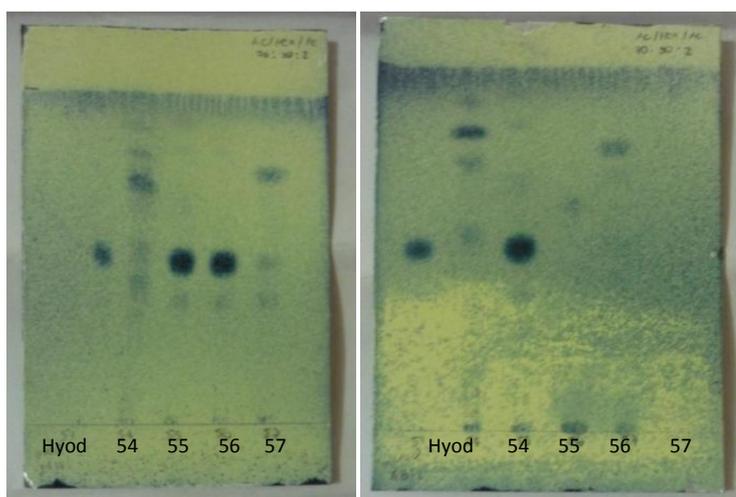
Anexo 15. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B45 y MM B48, Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.



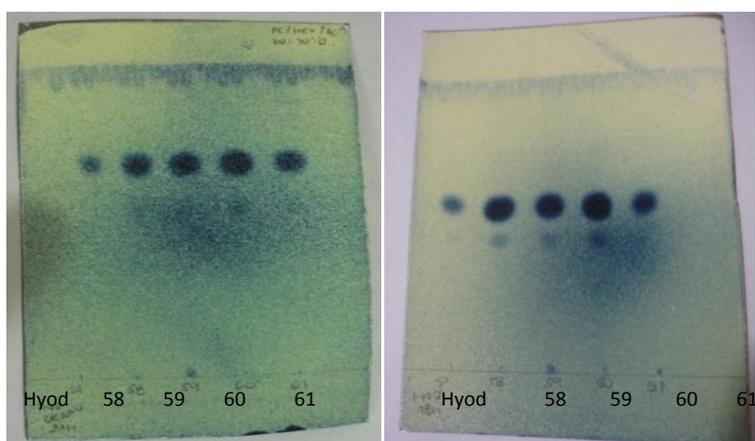
Anexo 16. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B50. Ácido hydesoxicólico, fase móvil 2.



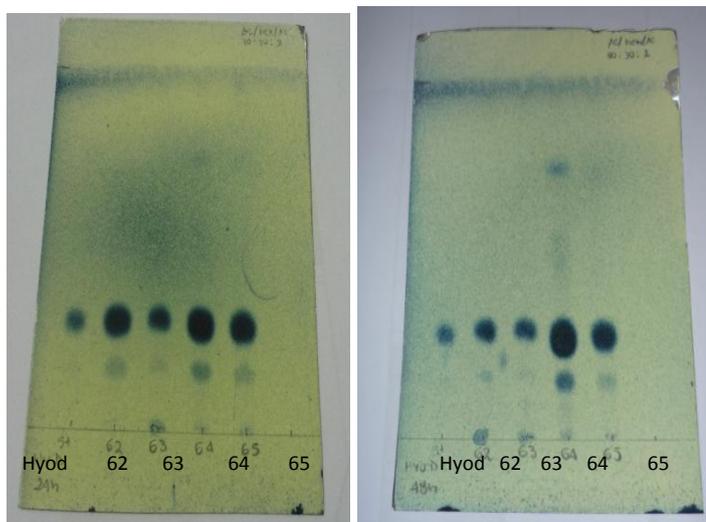
Anexo 17. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B54, MM B55 y MM B57. Ácido hydesoxicólico, fase móvil 2.



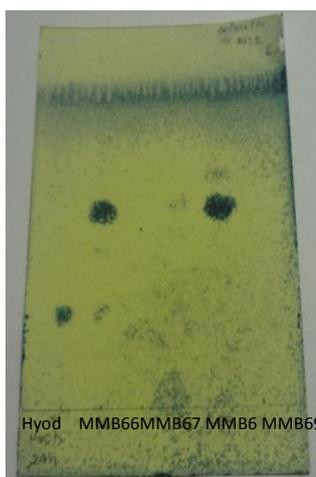
Anexo 18. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B58, MM B59 y MM B60. Ácido hydesoxicólico, fase móvil 2.



Anexo 19. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B62, MM B63, MM B64 y MM B65. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.



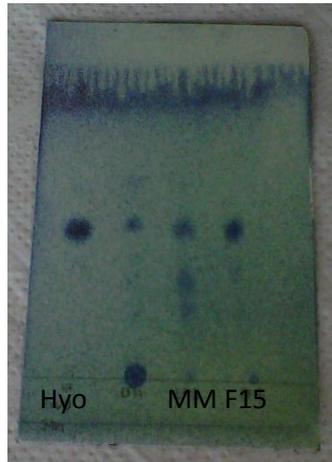
Anexo 20. Biotransformación 24 horas, bacterias MM B66, MM B67 y MM B68. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.



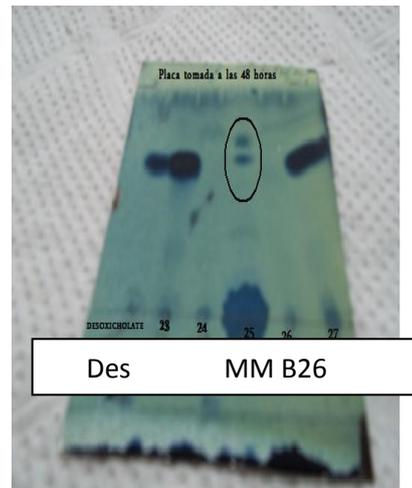
Anexo 21. Biotransformación 48 horas, hongos MM F12. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.



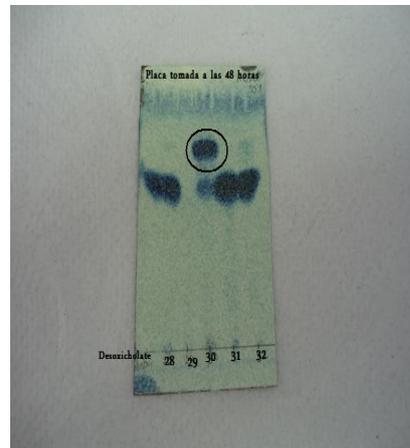
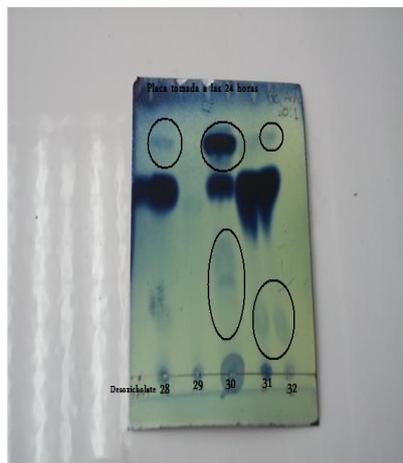
Anexo 22. Biotransformación 144 horas, hongos MM F15. Ácido hyodesoxicólico, fase móvil 2.



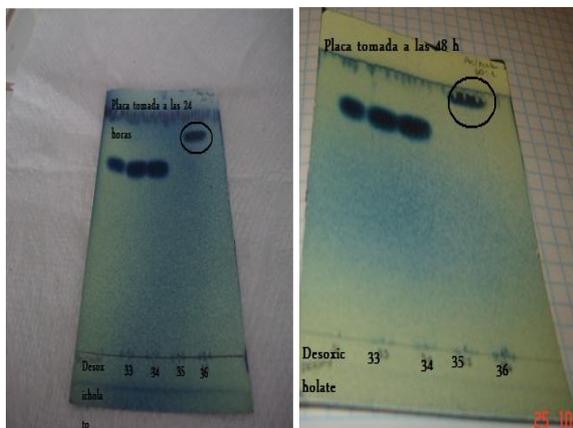
Anexo 23. Biotransformación 24 y 48 horas, bacteria MM B26. Ácido desoxicólico, fase móvil 1.



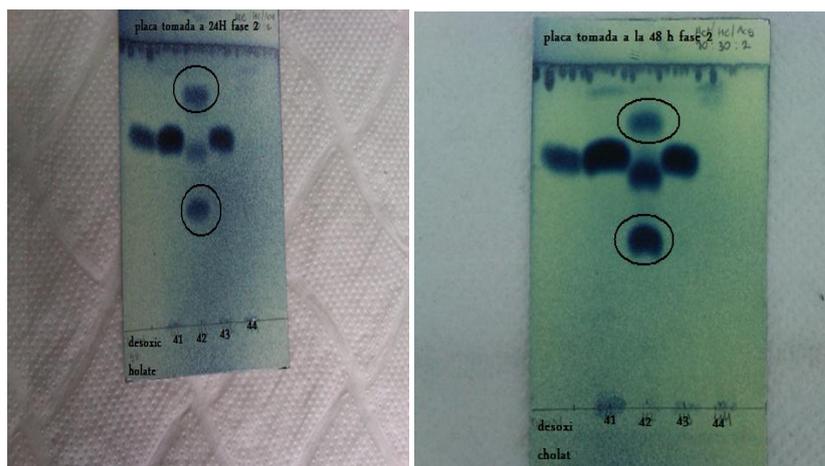
Anexo 24. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B30, MM B31 y MM B33. Ácido desoxicólico, fase móvil 1.



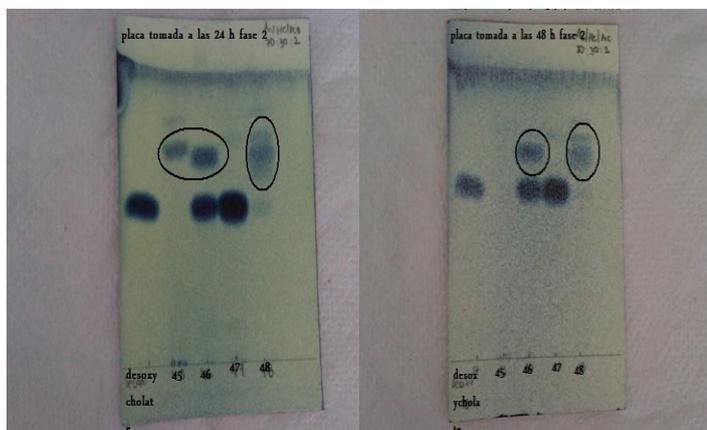
Anexo 25. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B36. Ácido desoxicólico, fase móvil 1.



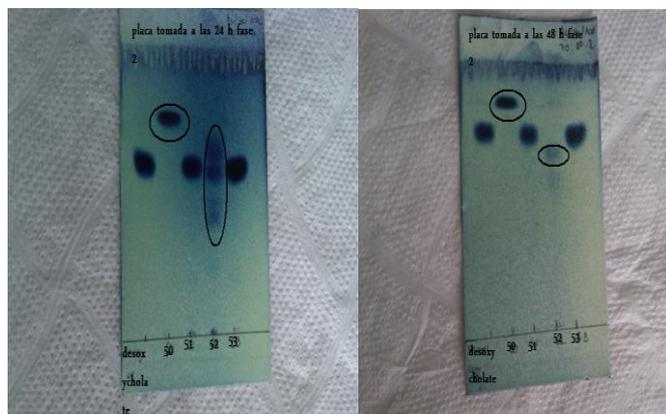
Anexo 26. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B42 y MM B44. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.



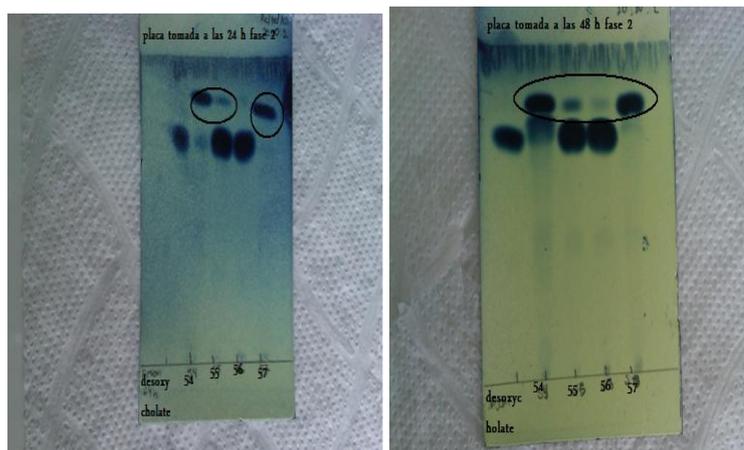
Anexo 27. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B45, MM B46 y MM B48. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.



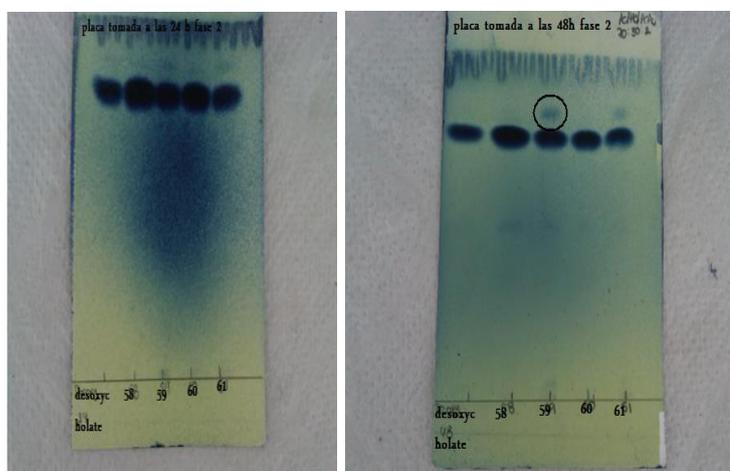
Anexo 28. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B50, MM B52. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.



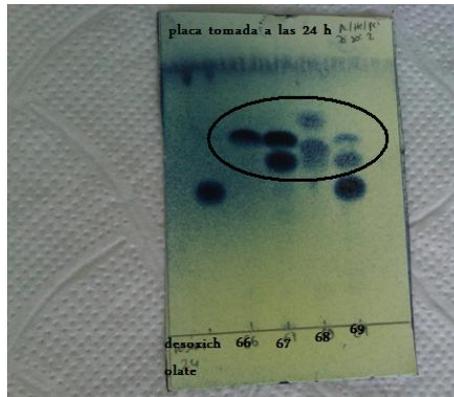
Anexo 29. Biotransformación 24 horas, bacterias MM B54, MM B55, MM B56 y MM B57. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.



Anexo 30. Biotransformación 24 y 48 horas, bacterias MM B59. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.



Anexo 31. Biotransformación 24 horas, bacterias MM B6, MM B67, MM B68, MM B69. Ácido desoxicólico, fase móvil 2.

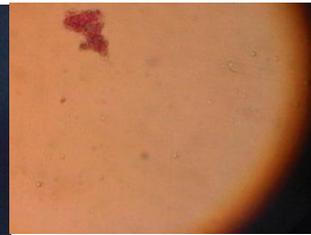


Anexo 32. Pruebas de tinción gram (Ácido desoxicólico)

EB66 GRAM NEGATIVA



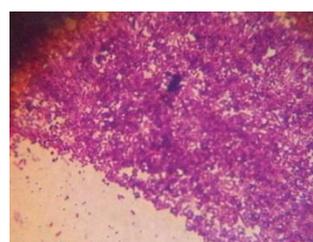
EB 67 GRAM NEGATIVA



EB42 GRAM NEGATIVA



EB26 GRAM NEGATIVA



Anexo 33. Identificación con pruebas API, Bacteria MM B36 (Ácido hydrosoxicólico)

Microgen GNA + B Oxidase Positive					
Specimen Details					
<i>Lab Ref.:</i>			<i>Date:</i> 24/07/2013		
<i>Name:</i> MISHEEL					
<i>Specimen Type:</i> EB 36					
<i>Source (ward/location):</i>					
Results Entry					
<i>Octal Code:</i> 760556001					
+ OXI	Oxidase	+ MOT	Motility	+ NIT	Nitrate Reduction
+ LYS	Lysine Decarboxylase	+ ORN	Ornithine Decarboxyl	- H2S	H2S Production
- GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
+ ONP	ONPG	- IND	Indole	+ UR	Urea Hydrolysis
+ VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	+ TDA	Tryptophan Deaminase
+ GEL	Gelatin Liquefaction	+ MAL	Malonate Inhibition	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	+ ARG	Arginine Dihydrolase
Identification Analysis					
	<i>V.alginolyticus</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>B.cepacia</i>
<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No
<i>Probability</i>	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
<i>Percent Probability</i>	97,35%	2,63%	0,01%	<0,01%	<0,01%
<i>Likelihood</i>	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Tests against</i>					
<i>Test 1</i>	UR (0,1%)	ONP (0,1%)	ORN (0,1%)	GLU (99,9%)	ORN (0,1%)
<i>Test 2</i>	TDA (0,1%)	VP (0,1%)	ONP (0,1%)	TDA (0,1%)	VP (0,1%)
<i>Test 3</i>	ARG (0,1%)	TDA (0,1%)	VP (0,1%)	ORN (1%)	ARG (0,1%)
<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Oxidation of Glucose</i>	0,1%	99,9%	99,9%	0,1%	99,9%
<i>Growth on SS Agar</i>	77%	96%	54%	97%	6%
<i>Growth in 0% NaCl</i>	0,1%	99,9%	96%	99,9%	99,9%
<i>Growth in 6% NaCl</i>	99,9%	65%	80%	14%	7%
<i>Growth on Cetrimide</i>	0%	94%	0,1%	0%	44%
<i>Additional Comments</i>					4

Anexo 34. Identificación con pruebas API, Bacteria MM B39 (Ácido hyodesoxicólico)

Microgen GNA + B Oxidase Positive					
Specimen Details					
Lab Ref:		Date: 24/07/2013			
Name: MISHEEL					
Specimen Type: EB 39					
Source (ward/location):					
Results Entry					
Octal Code: 407103647					
+ OXI Oxidase	- MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction			
- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production			
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose			
- ONP ONPG	- IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis			
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase			
- GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Inhibition	+ INO Acid from Inositol			
+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose			
+ LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol			
+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase			
Identification Analysis					
	<i>B.pseudomallei</i>	<i>Actinobacillus spp.</i>	<i>P.multocida</i>	<i>P.haemolytica</i>	<i>Ps.fluorescens-25</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	100%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	MOT (99.9%)	INO (0.1%)	MAL (1%)	UR (0.1%)	CIT (99.9%)
Test 2	RHA (6%)	RHA (0.1%)	RHA (1%)	MAL (0.1%)	RHA (0.1%)
Test 3	RAF (6%)	ARG (0.1%)	RAF (1%)	RHA (0.1%)	LAC (0.1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Oxidation of Glucose	99.9%	0.1%	0.1%	0.1%	99.9%
Growth on MacConkey	99.9%	82%	2%	79%	99.9%
Growth on SS Agar	8%	0.1%	0.1%	0.1%	96%
Esculin Hydrolysis	50%	0.1%	0.1%	25%	0.1%
Growth at 42C	99.9%	15%	32%	50%	0.1%
Additional Comments	5 Previously Pseudomonas pseudomallei				

Anexo 35. Identificación con pruebas API Bacteria MM B66 (Ácido desoxicólico)

Microgen GNA + B Oxidase Positive					
Specimen Details					
Lab Ref:		Date: 24/07/2013			
Name: ANDREA					
Specimen Type: EB 66					
Source (ward/location):					
Results Entry					
Octal Code: 467001104					
+ OXI Oxidase	- MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction			
+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production			
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose			
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis			
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase			
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	+ INO Acid from Inositol			
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose			
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol			
+ RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase			
Identification Analysis					
	<i>P.multocida</i>	<i>P.haemolytica</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>B.pseudomallei</i>	<i>V.alginolyticus</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	93,67%	6,33%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	LYS (1%)	LYS (0.1%)	NIT (99.9%)	MOT (99.9%)	MOT (99.9%)
Test 2	RAF (1%)	ORN (0.1%)	INO (0.1%)	ORN (0.1%)	NIT (99.9%)
Test 3	INO (5%)	NIT (95%)	SUC (0.1%)	RAF (6%)	XYL (0.1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth in 6% NaCl	2%	3%	99.9%	12%	99.9%
Oxidation of Glucose	0.1%	0.1%	0.1%	99.9%	0.1%
Esculin Hydrolysis	0.1%	25%	10%	50%	34%
Growth on MacConkey	2%	79%	99.9%	99.9%	99.9%
Growth on SS Agar	0.1%	0.1%	94%	8%	77%
Additional Comments	5 Previously Pseudomonas pseudomallei				

Anexo 36. Identificación con pruebas API, Bacteria MM B26 (Ácido desoxicólico)

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref:

Name: ANDREA

Specimen Type: EB 26

Source (ward/location):

Date: 24/07/2013

Results Entry

Octal Code: 45514001

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

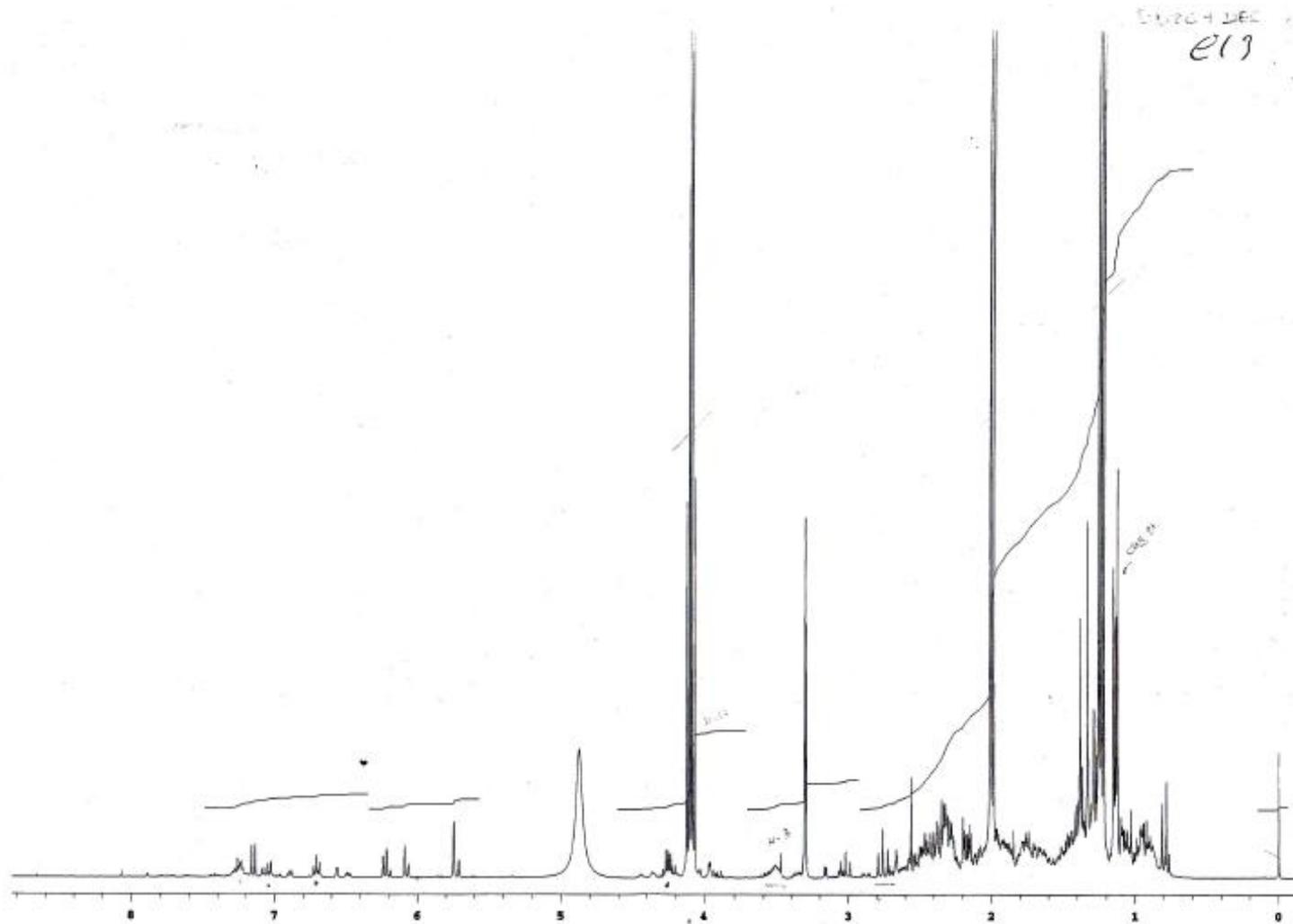
Identification Analysis

	<i>P.penneri</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>M.morganii ssp.Siboni 1</i>	<i>M.morganii biogr 1</i>	<i>P.mirabilis</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	94,46%	2,67%	1,17%	0,9%	0,65%
Likelihood	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	LYS (0,1%)	LYS (0,1%)	XYL (0,1%)	XYL (0,1%)	LYS (0,1%)
Test 2	SUC (99,9%)	ARG (0,1%)	ONP (0,1%)	IND (99,9%)	ONP (0,1%)
Test 3	ARG (0,1%)	ONP (1%)	GEL (0,1%)	GEL (0,1%)	ARG (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Acid from Maltose	99,9%	97%	0,1%	0,1%	0,1%
Acid from Trehalose	55%	30%	99,9%	0,1%	98%
DNase (25C)	40%	80%	0,1%	0,1%	50%
Acid from Mannose	0,1%	0,1%	99,9%	99,9%	0,1%
Esculin Hydrolysis	0,1%	50%	0,1%	0,1%	0,1%
Additional Comments	41			36	

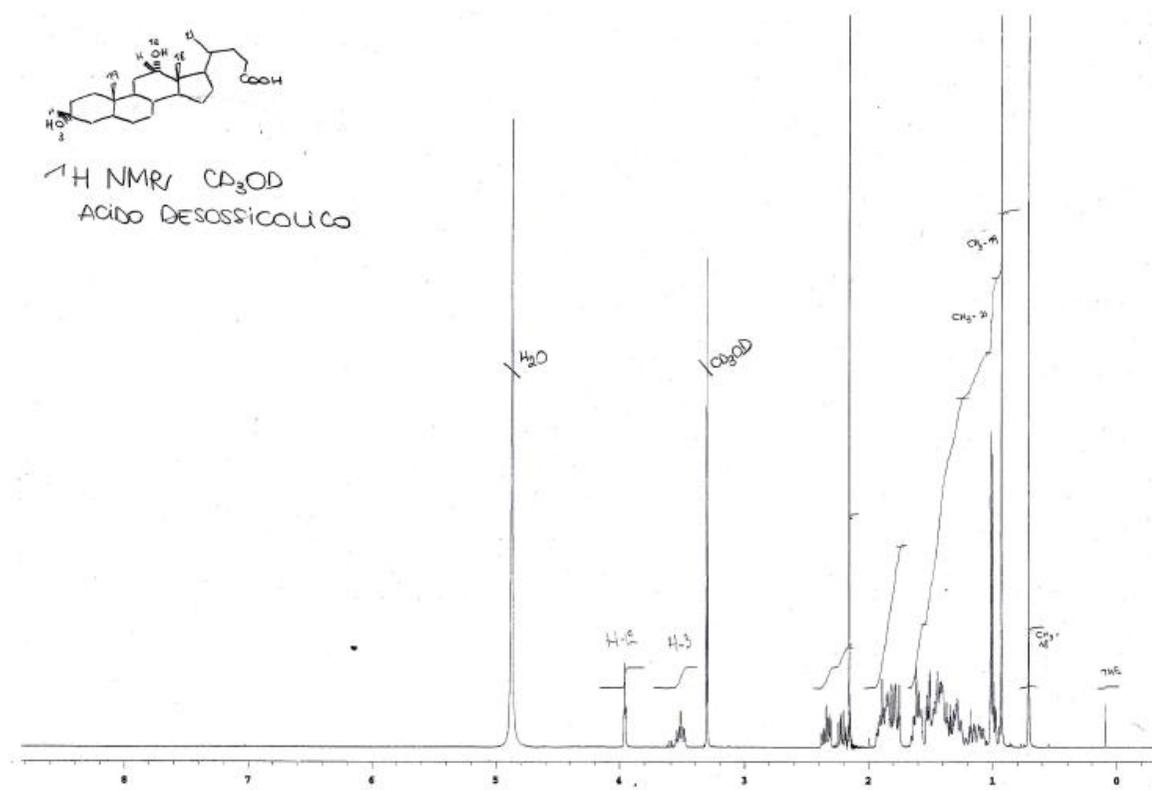
36 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1992) 42 : 613-620

41 Previously *Proteus vulgaris* indole negative. J. Clin. Microbiol. (1982) 15 : 1097-1102

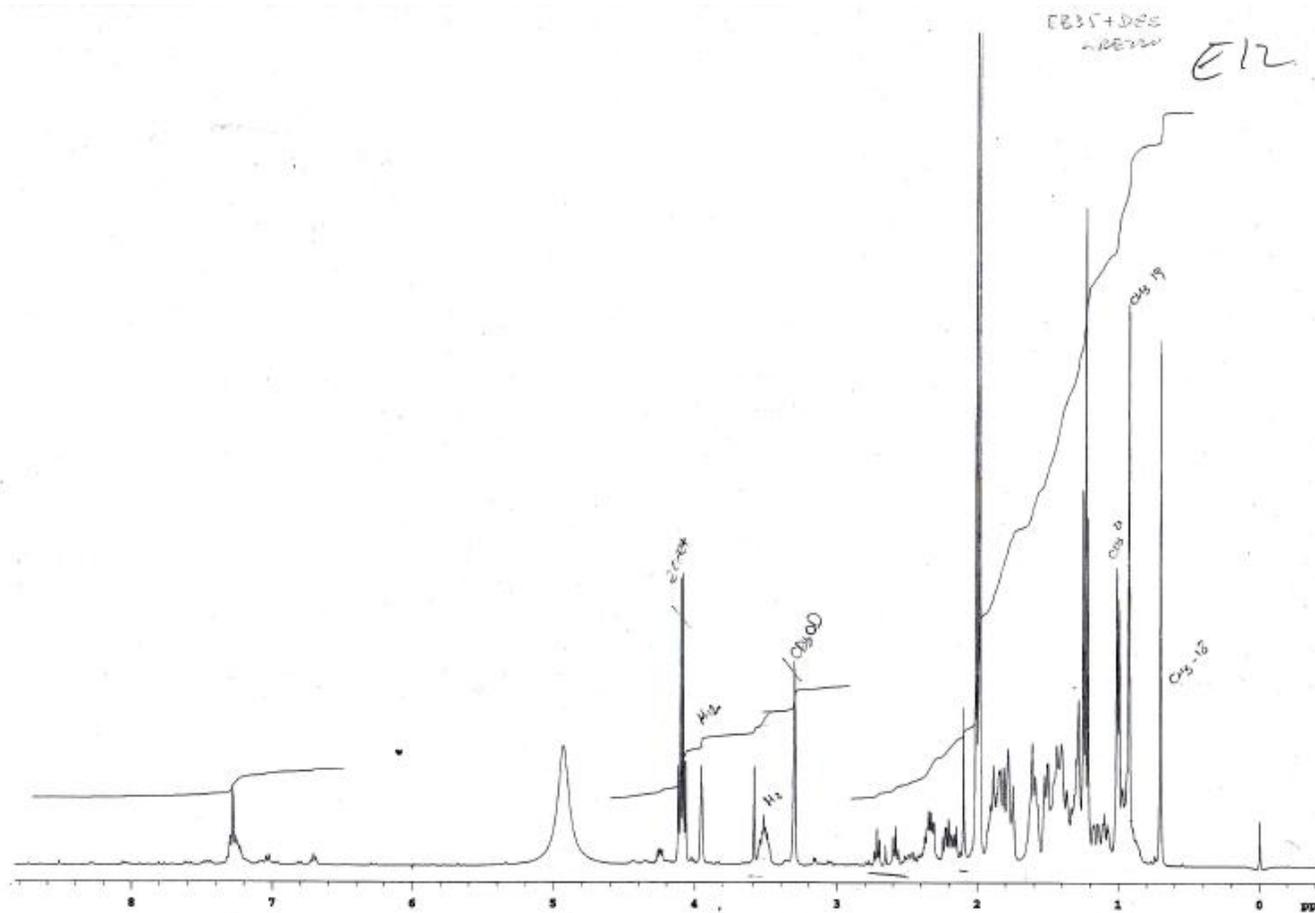
Anexo 37. MM B26: Ácido desoxicólico



Anexo 38. MM B26: Ácido desoxicólico



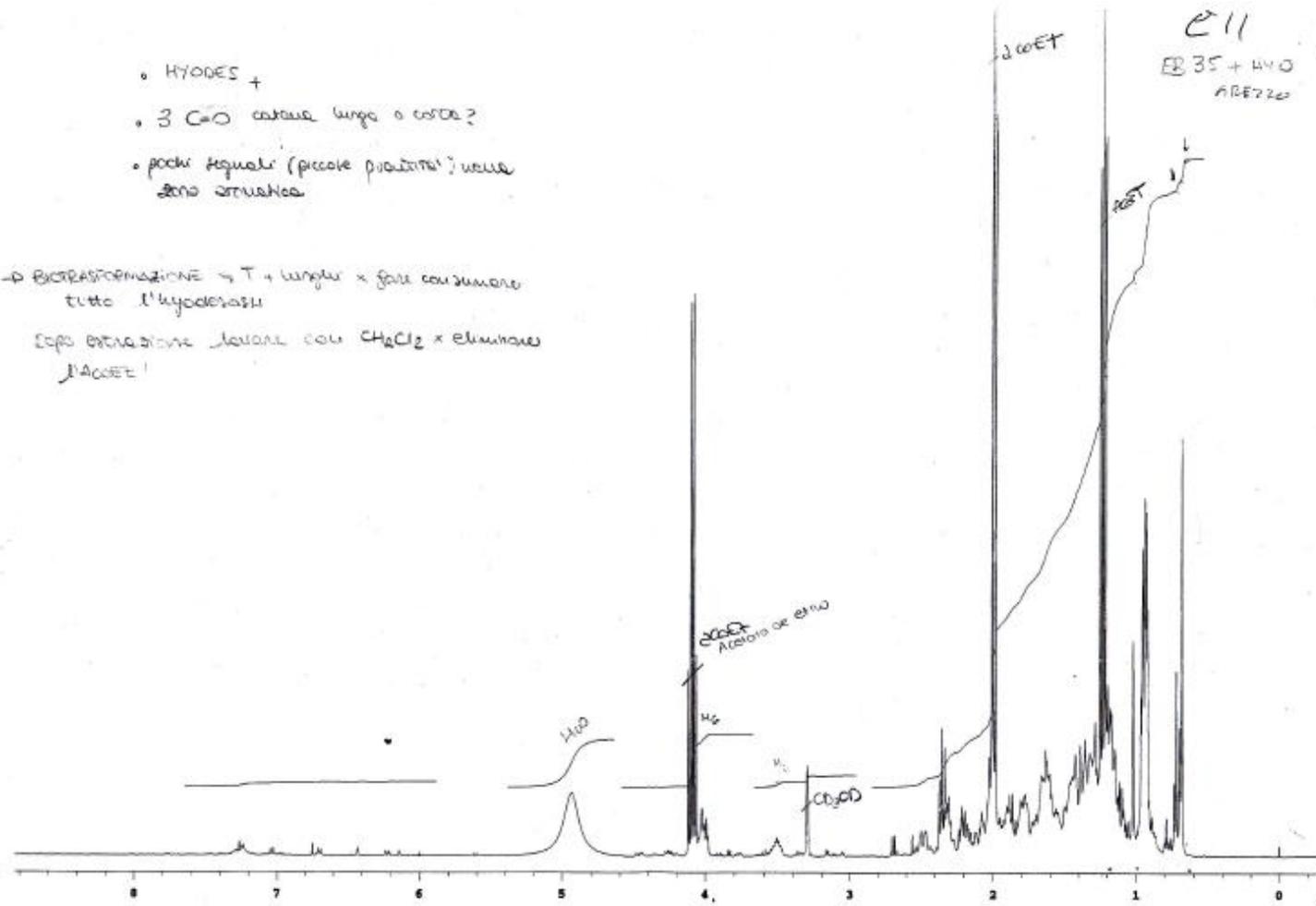
Anexo 39. MM B35: Ácido desoxicólico



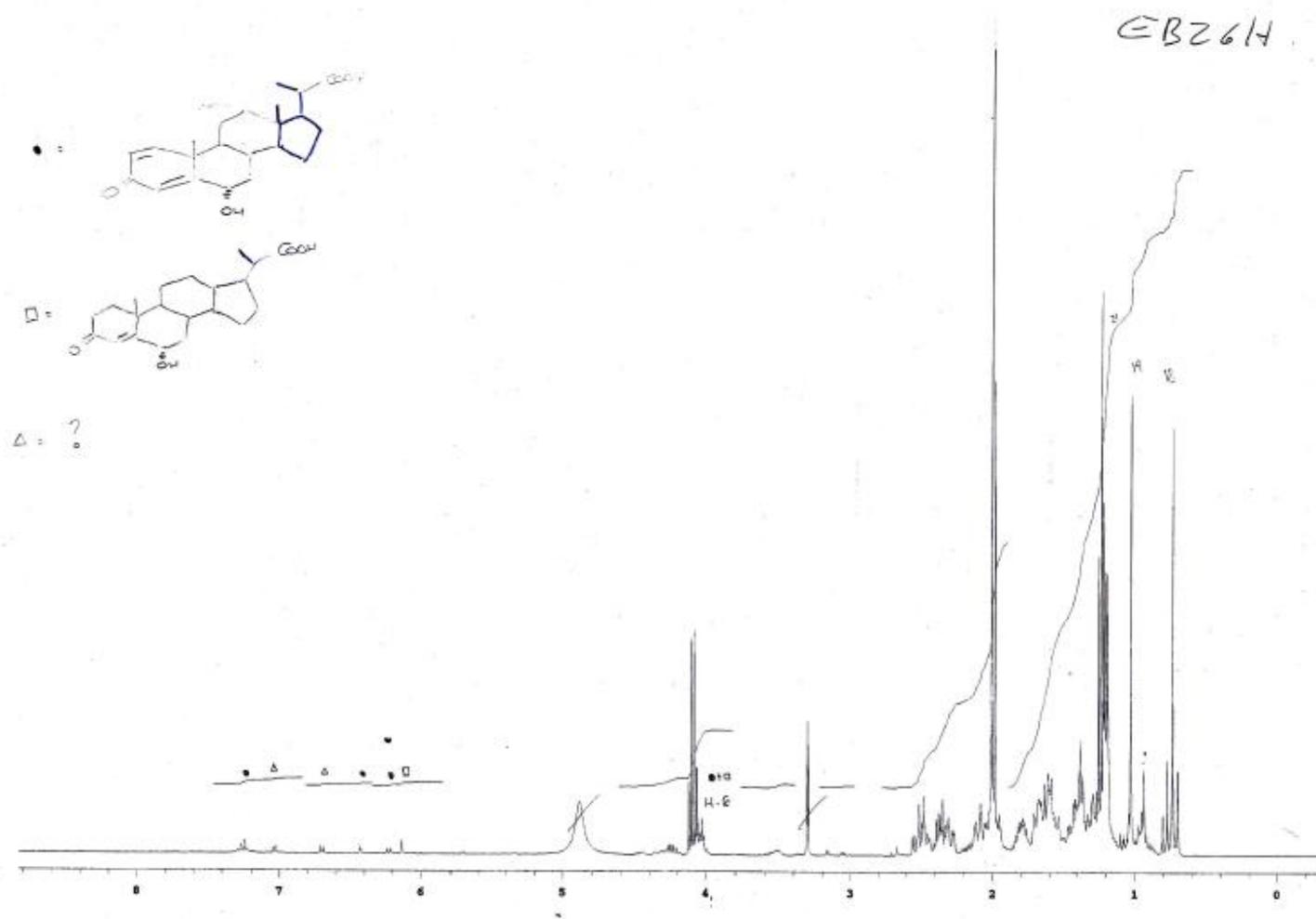
Anexo 40. MM B35: Ácido hydodesoxicólico

- HYODES +
- 3 C=O catene lunga o corta?
- pochi segnali (piccole quantità) nelle zone aromatiche

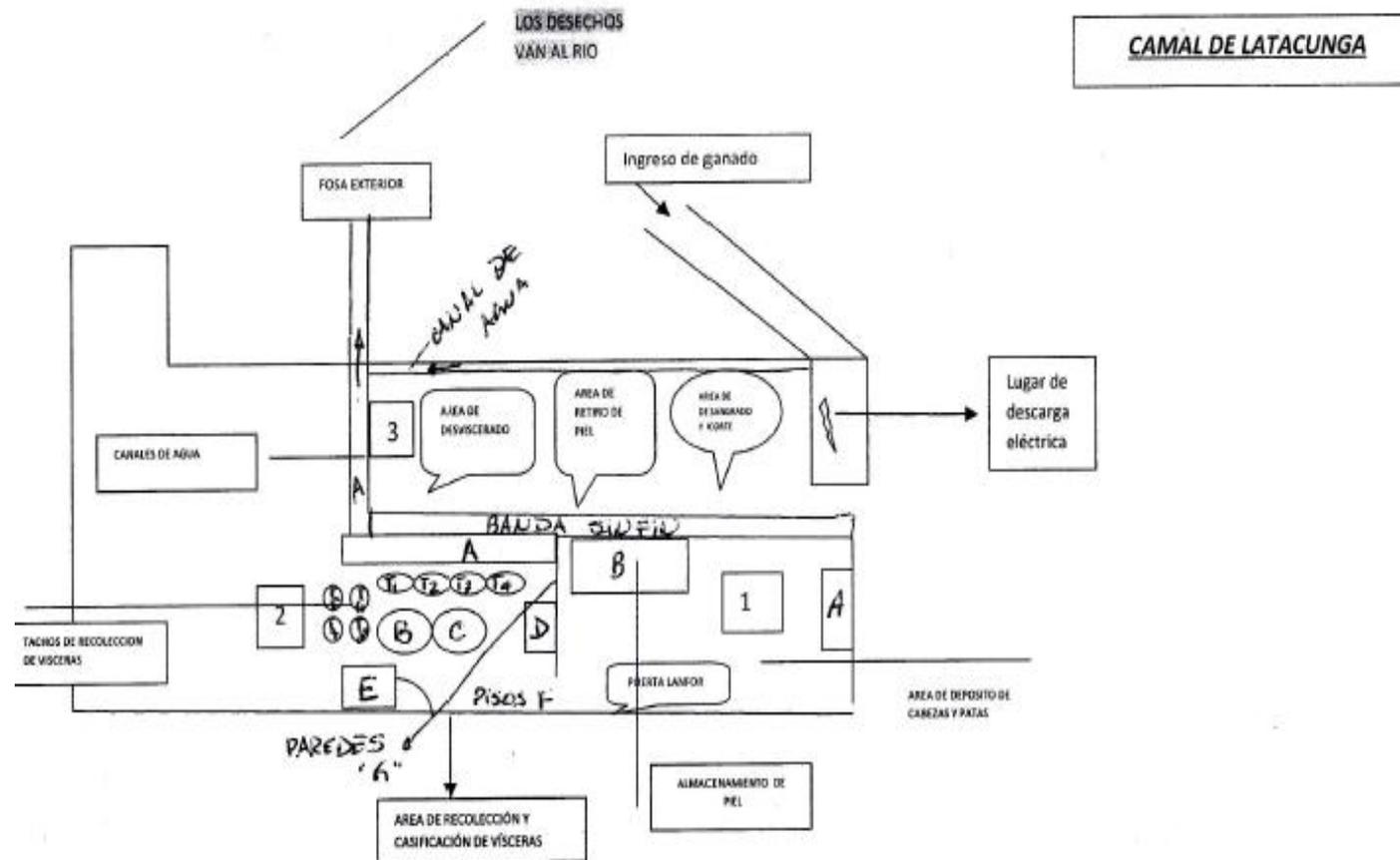
→ BICRISTALLIZZAZIONE → T + liquido × fare consumare tutto l'hydodesol
 Dopo estrazione lavare con CH₂Cl₂ × eliminare l'Acet!



Anexo 41. MM B26: Ácido hyodesoxicólico



Anexo 42. Esquema del Camal Metropolitano de Latacunga



Anexo 43. Esquema del Camal Metropolitano de Cayambe

