



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
“BIOCHIMICA, BIOLOGIA MOLECOLARE, BIOTECNOLOGIE”

CICLO XXV

COORDINATORE: Prof. Francesco Bernardi

## **Biotrasformazioni di Acidi Biliari**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

**Dottoranda**

Dott. Maria Elena Maldonado Rodríguez

**Tutore**

Prof. Alessandro Medici

**Co-tutore**

Prof. Paola Pedrini

Anni 2010/2012



Il tuo indirizzo e-mail

mariaelena.maldonado@student.unife.it

Oggetto:

Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Maldonado Rodríguez Maria Elena

Nato a:

Quito - Ecuador

Provincia:

Pichincha

Il giorno:

16 Settembre 1963

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

Biochimica, Biologia Molecolare, Biotecnologia

Ciclo di Dottorato

25

Titolo della tesi:

Biotrasformazioni di Acidi Biliari

Titolo della tesi (traduzione):

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Medici Alessandro

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

CHIM/06

Parole chiave della tesi (max 10):

Biotrasformazioni

Consapevole, dichiara

**CONSAPEVOLE:** (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie di cui una in formato cartaceo e una in formato pdf non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito: <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze; **DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ:** (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in

formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; (3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; (4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma del dottorando

Ferrara, li 7/3/2013 (data) Firma del Dottorando

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore

A. Tedici

A Ruth Isabel e a Rafael

per il loro sostegno e la loro pazienza in questi tre anni di lavoro.

# INDICE

<b>Introduzione</b>	<i>pag. 1</i>
➤ Bile ed acidi biliari	<i>pag. 2</i>
➤ Aspetti fisiologici	<i>pag. 6</i>
➤ Biosintesi degli acidi biliari	<i>pag. 10</i>
➤ Relazione tra struttura e attività degli acidi biliari	<i>pag. 14</i>
➤ Alterazioni delle funzioni biliari	<i>pag. 17</i>
➤ Caratteristiche farmacologiche degli acidi biliari	<i>pag. 21</i>
➤ Le biotrasformazioni	<i>pag. 26</i>
➤ Le biotrasformazioni degli acidi biliari	<i>pag. 31</i>
➤ I macelli in Ecuador: gestione della bile ed impatto ambientale	<i>pag. 35</i>
<b>Progetto e strategia</b>	<i>pag. 50</i>
<b>Materiali e Metodi</b>	<i>pag. 53</i>
<b>Risultati e discussione</b>	<i>pag. 89</i>
<b>Bibliografia</b>	<i>pag. 101</i>

## **INTRODUZIONE**

## Bile ed Acidi biliari

La bile è una soluzione elettrolitica a pH 6.8-8 ottenuta dalle cellule epatiche e dalle cellule dei canalicoli biliari in una quantità giornaliera che va da 500 a 1500 millilitri.

La bile sintetizzata dal fegato viene secreta nei piccoli dotti biliari dove, attraversando il dotto epatico comune e il dotto cistico, viene immagazzinata nella cistifellea.

Nell'uomo la cistifellea ha la forma di sacchetto e si trova al di sotto del margine anteriore del lobo destro del fegato: la sua funzione è quella di accumulare e concentrare la bile.

In seguito a contrazioni della parete muscolare della colecisti, la bile viene quindi escreta nel coledoco (dotto originato dall'unione tra il dotto cistico della cistifellea e il dotto epatico del fegato che sfocia nel duodeno) per arrivare così all'intestino.

La composizione della bile è riportata nella Tabella 1.

**Tabella 1.** Composizione della bile

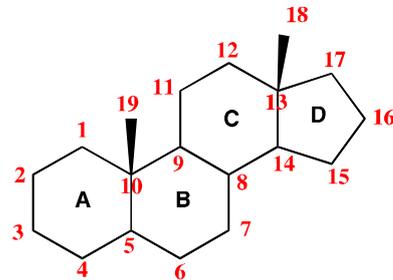
	<b>Bile Epatica</b>	<b>Bile colecistica</b>
Acqua	97.5 %	82 %
Acidi biliari	1.1 %	3-10 %
Bilirubina	0.2 %	0.6-2 %
Acidi grassi	0.12 %	0.3-1.2 %
Colesterolo	0.1 %	0.3-0.9 %
Lecitina	0.04 %	0.1-0.4 %
Na <sup>+</sup>	145 mEq/l	130 mEq/l
K <sup>+</sup>	5 mEq/l	9 mEq/l
Ca <sup>2+</sup>	5 mEq/l	12 mEq/l
Cl <sup>-</sup>	100 mEq/l	75 mEq/l
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	28 mEq/l	10 mEq/l

La bile epatica ha una diversa composizione percentuale rispetto a quella colicistica in quanto la cistifellea svolge una funzione di concentrazione della bile mediante l'assorbimento di elettroliti (ad es. Na, P). I componenti più importanti della bile sono gli acidi biliari (acido colico e acido chenodesossicolico). Questi vengono prodotti dagli epatociti a partire dal colesterolo e successivamente, vengono coniugati a due amminoacidi: taurina e glicina.

Al pH fisiologico della bile e dell'intestino (6.8-8) gli acidi biliari si trovano in forma dissociata e per questo motivo vengono anche denominati sali biliari. Inoltre essendo il

prodotto finale del metabolismo epatocitario del colesterolo, essi vengono classificati come steroidi.

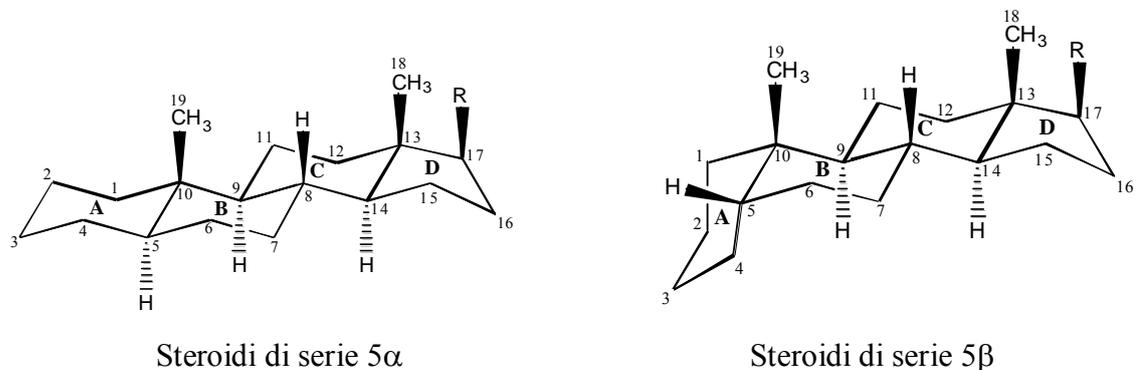
La struttura base degli steroidi è l'anello ciclopentanperidrofenantrenico<sup>1</sup> (Figura 1).



**Figura 1**

Negli steroidi gli anelli cicloesanic A, B e C hanno in generale conformazione a sedia; inoltre si può notare che, mentre le giunzioni degli anelli B, C e D sono sempre *trans* (gli idrogeni in C-8 e C-9 e il metile in C-13 e l'idrogeno in C-14), la giunzione tra gli anelli A e B può essere sia *cis* sia *trans* (Figura 2).

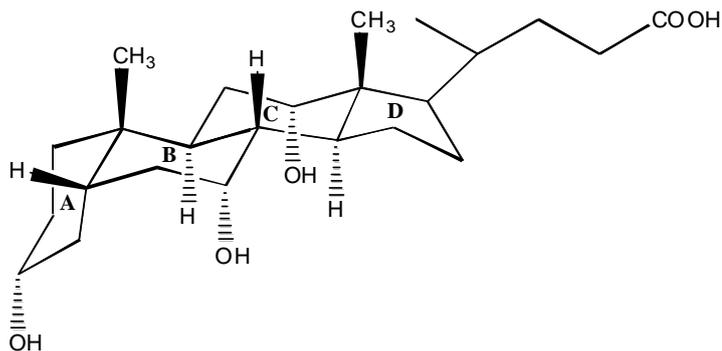
Avremo così gli steroidi della serie 5 $\alpha$  in cui la giunzione degli anelli A e B è *trans* e l'idrogeno in C-5 è orientato verso il basso ( $\alpha$ ) rispetto al metile in C-10 ( $\beta$ ) (*trans* tra l'idrogeno in C-5 e il metile in C-10).



**Figura 2**

Gli steroidi della serie 5 $\beta$  invece presentano una saldatura *cis* tra gli anelli A e B: l'idrogeno in C-5 è dalla stessa parte ( $\beta$ ) del metile angolare in C-10.

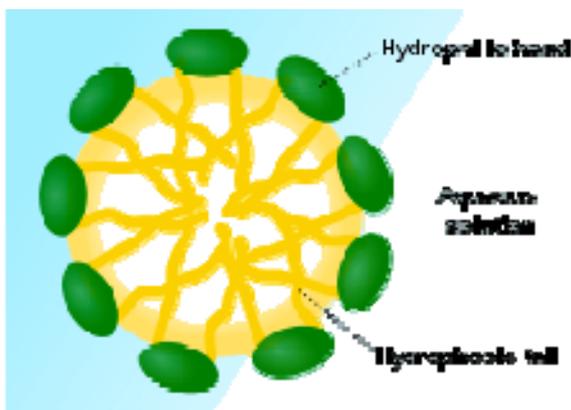
Gli acidi biliari sono steroidi a 24 atomi di carbonio della serie 5 $\beta$ . Gli ossidrili presenti sull'anello steroidico sono tutti in posizione  $\alpha$  rispetto al piano dell'anello definendo così una struttura nella quale l'acido presenta una parte polare ed una apolare<sup>2</sup> (Figura 3).



**Figura 3**

Per questa ragione la molecola viene definita anfipatica quindi in grado di interporre tra una fase polare ed una apolare.

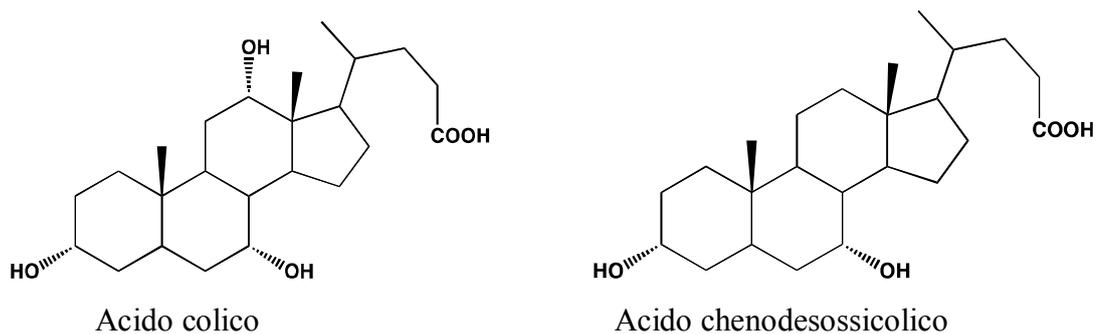
Per queste caratteristiche gli acidi biliari vengono considerati molecole molto importanti in quanto sono in grado, in soluzione acquosa, di formare micelle aggregando le parti lipofile. Le micelle sono piccoli ammassi di molecole in cui i gruppi polari si trovano all'esterno mentre quelli apolari sono localizzati all'interno (Figura 4).



**Figura 4**

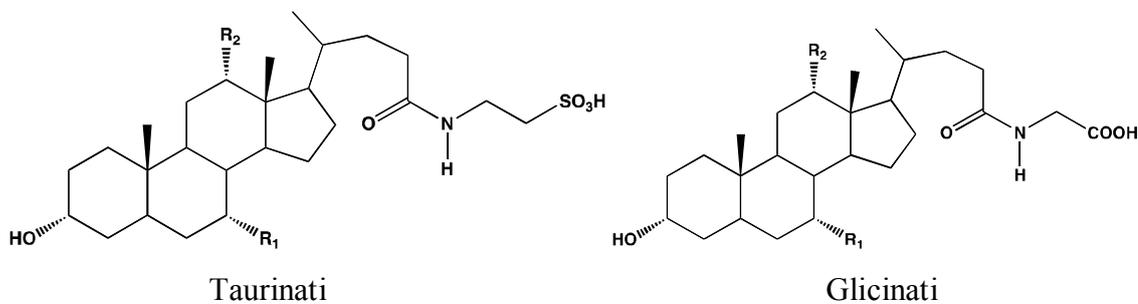
Nella bile umana si trovano due tipi di acidi biliari detti primari (Figura 5):

- 1 L'acido colico (acido  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triidrossicolanico);
- 2 L'acido chenodesossicolico (acido  $3\alpha,7\alpha$ -diidrossicolanico).



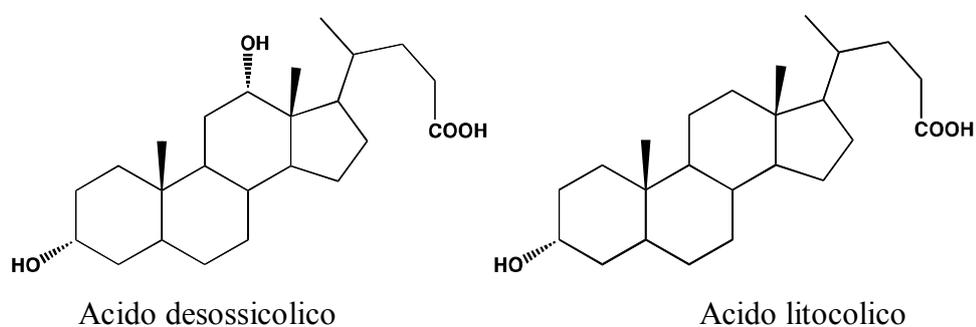
**Figura 5**

Questi acidi sono presenti principalmente come coniugati con gli amminoacidi taurina e glicina legati al gruppo carbossilico mediante un legame ammidico (Figura 6).



**Figura 6**

Nella bile sono presenti anche anche acidi biliari secondari come acido desossicolico e acido litocolico, prodotti rispettivamente dall'acido colico e chenodesossicolico ad opera della flora batterica intestinale mediante una reazione di deidrossillazione in posizione C-7 (Figura 7).



**Figura 7**

## Aspetti fisiologici

Gli acidi biliari rappresentano il prodotto terminale del catabolismo epatocitario del colesterolo. In condizioni fisiologiche l'acido colico e l'acido chenodesossicolico vengono sintetizzati a partire dal colesterolo negli epatociti.

Le trasformazioni più interessanti riguardanti gli acidi biliari dal punto di vista fisiologico, sono schematicamente rappresentate nello Schema 1.

Come detto in precedenza l'acido colico e chenodesossicolico vengono secreti nella bile sotto forma di sali sodici e coniugati con gli amminoacidi glicina e taurina. La bile, secreta dal fegato, viene versata nel duodeno passando per le vie biliari. A livello dell'intestino tenue si svolge infatti l'azione fisiologica principale degli acidi biliari che è quella di permettere la digestione e l'assorbimento dei lipidi.

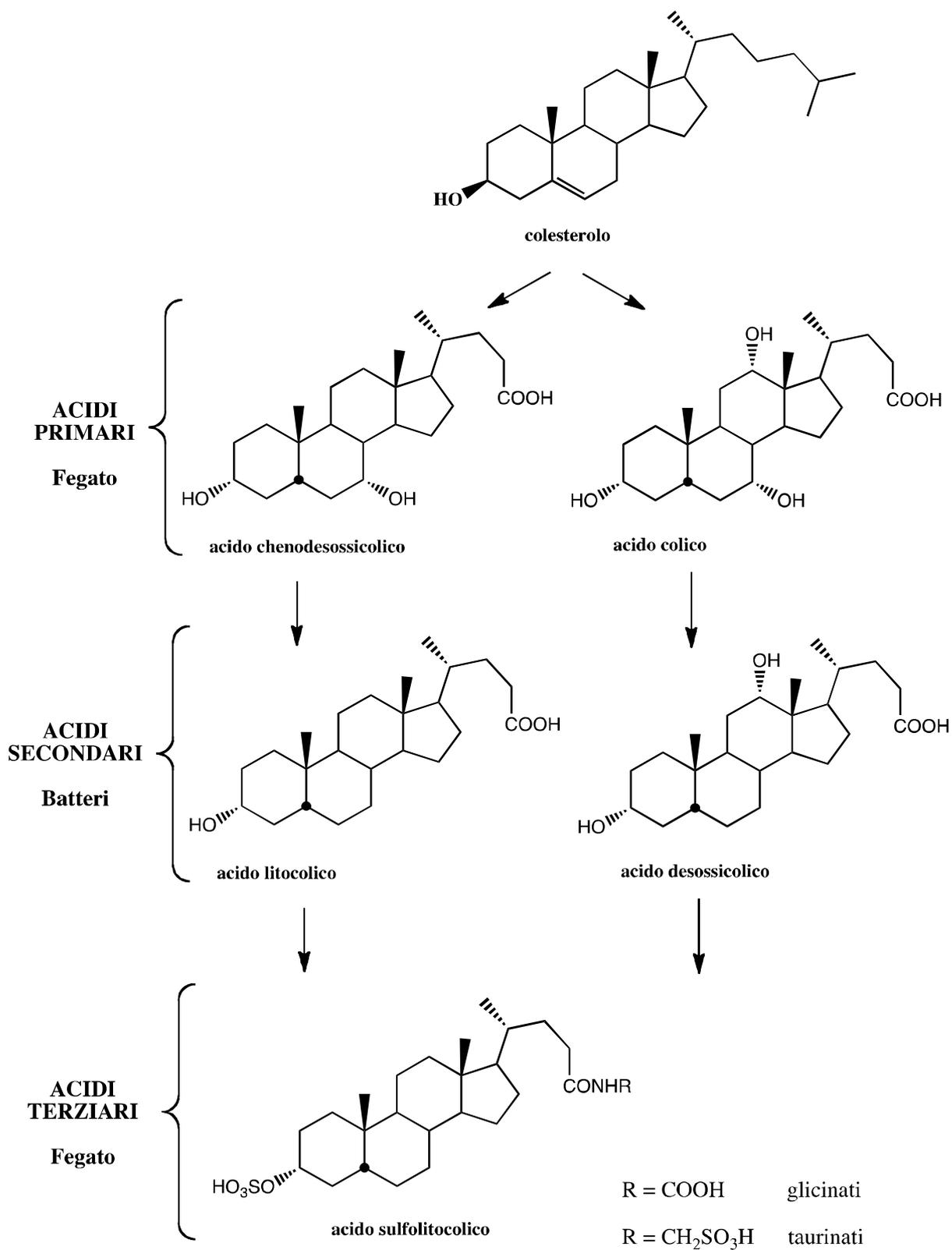
Nel lume intestinale il 10-15% degli acidi biliari primari viene deconiugato e deidrossilato in C-7 ad opera della flora batterica intestinale.

Da queste trasformazioni si formano gli acidi biliari secondari: acido desossicolico e acido litocolico che come i loro predecessori vengono assorbiti a livello intestinale.

Successivamente gli acidi biliari sono convogliati al fegato per via portale ed escreti nella bile dopo essere stati nuovamente coniugati con glicina e taurina.<sup>3</sup> A livello epatico ed intestinale gli acidi biliari subiscono diverse trasformazioni. L'acido litocolico, di cui è nota l'epatotossicità, a livello epatico viene solfatato per aumentare l'idrosolubilità e diminuire conseguentemente il riassorbimento. A livello intestinale invece avviene l'idrolisi della glicina e della taurina nei coniugati e l'epimerizzazione nella posizione 7 dell'acido chenodesossicolico a ursodesossicolico ad opera della flora batterica intestinale. La composizione finale degli acidi biliari è quindi determinata dalle trasformazioni operate dagli enzimi epatici e della flora batterica intestinale.<sup>4</sup>

Le principali funzioni fisiologiche degli acidi biliari sono:

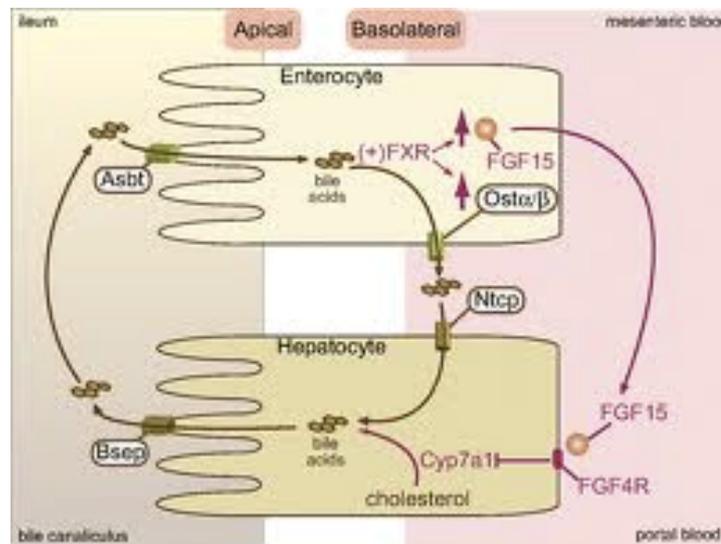
- **la regolazione della secrezione biliare:** lo stimolo più importante per la secrezione biliare sembra infatti essere il contenuto nel sangue portale in sali biliari riassorbiti dall'intestino tenue al termine della digestione intestinale.



Schema 1

- **il trasporto biliare e l'emulsione dei lipidi quali il colesterolo:** il colesterolo si trova nella bile in notevole quantità sebbene non sembri assolvere alcuna particolare funzione. Il colesterolo eliminato con la bile in parte proviene dai cibi ed in parte è sintetizzato dall'organismo.
- **la cooperazione nella digestione ed assorbimento intestinale dei lipidi:** come detto in precedenza i sali biliari sono sostanze fortemente tensioattive ed abbassando la tensione superficiale dell'acqua facilitano l'emulsione delle sostanze lipidiche. L'emulsione dei grassi in finissime goccioline è indispensabile sia per la loro scissione enzimatica ad opera delle lipasi (pancreatica ed intestinale), sia per il loro assorbimento.
- **la capacità di complessare cationi:** il  $\text{Fe}^{++}$  ed il  $\text{Ca}^{++}$  vengono complessati favorendone l'assorbimento intestinale.<sup>5</sup>

Oltre a queste funzioni altre ne sono state messe in luce negli anni passati. Recenti scoperte hanno dimostrato che gli acidi biliari sono coinvolti nel controllo del loro stesso metabolismo e trasporto via la circolazione enteropatica, regolano il metabolismo dei lipidi, del glucosio, controllano gli eventi segnale nella rigenerazione del fegato e la regolazione della spesa di energia totale (Figura 8).



**Figura 8**

A seguito dell'isolamento e della caratterizzazione dei recettori X farnesoidi (FXRs) di cui gli acidi biliari sono i ligandi fisiologici, sono cominciate ad emergere le funzioni degli

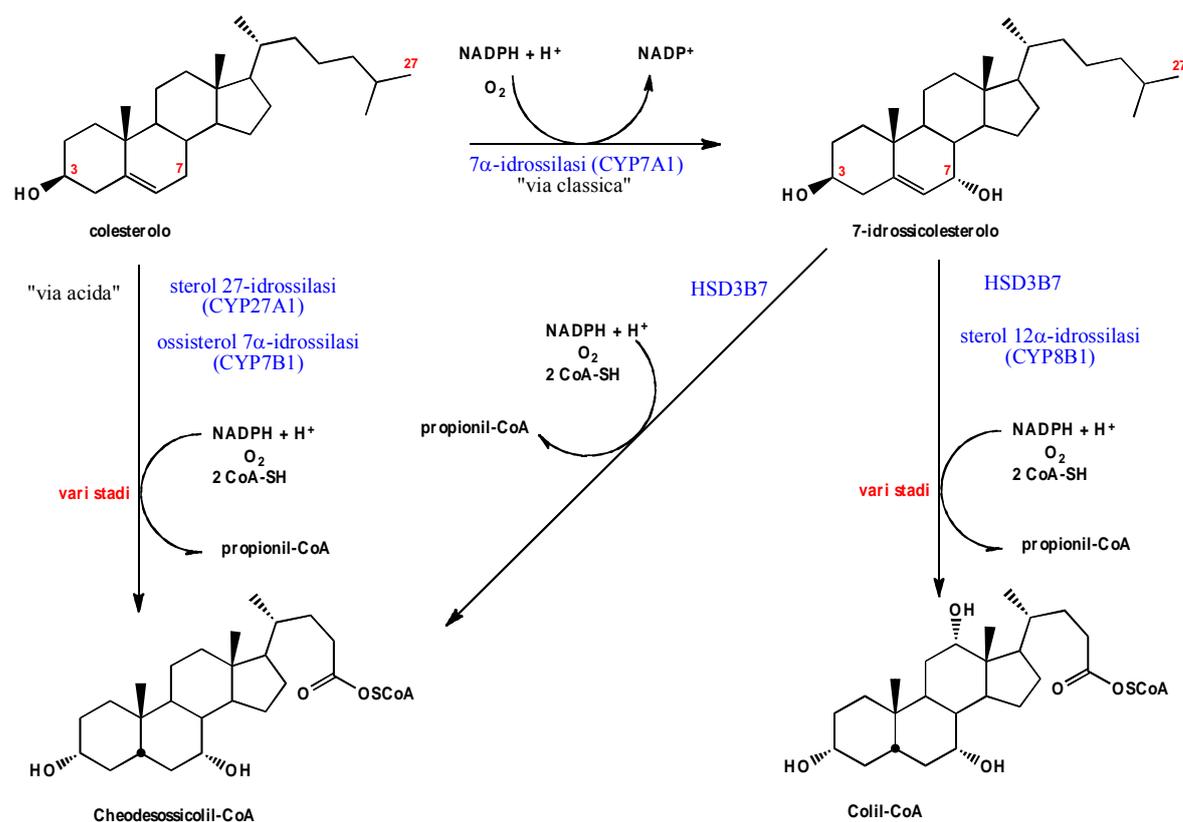
acidi biliari nella regolazione dell'omeostasi dei lipidi e del glucosio. Il legame degli acidi biliari ai FXRs provoca un'espressione attenuata di parecchi geni coinvolti nella totale omeostasi degli acidi stessi. D'altra parte i geni coinvolti nel metabolismo degli acidi biliari non solo i soli regolati dall'azione di FXRs come conseguenza del legame con gli acidi biliari.



La via metabolica iniziata con CYP7A1 è considerata la via "classica" o "neutra" della sintesi degli acidi biliari. Vi è un percorso alternativo che prevede l'idrossilazione del colesterolo in C-27 per mezzo dell'enzima mitocondriale sterol 27-idrossilasi (CYP27A1). Questa via alternativa è detta la via "acida" della sintesi.

Sebbene nei topi questa seconda via sia presente per un 25% del totale della sintesi, nell'uomo questo percorso è seguito per non più del 6%. Gli acidi biliari intermedi prodotti da CYP27A1 sono successivamente idrossilati in posizione C-7 da ossisterol 7 $\alpha$ -idrossilasi (CYP7B1). Sebbene la via acida non sia il percorso principale nell'uomo per la sintesi degli acidi biliari, essa è importante come dimostrato dal fenotipo che si presenta in un neonato che nasconde una mutazione nel gene CYP7B1. Questo bambino mostra una severa colestasi (blocco nel flusso biliare dal fegato) con cirrosi e disfunzioni epatiche.

Il gruppo idrossilico C-3 del colesterolo deve epimerizzare da  $\beta$  ad  $\alpha$  durante la sintesi. Questa epimerizzazione prevede l'ossidazione del 3 $\beta$ -idrossile a 3-osso derivato da catalizzata 3 $\beta$ -idrossi- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroidi ossidoreduttasi (HSD3B7) (Schema 3).



Schema 3

Che questa sia la reazione critica nella sintesi degli acidi biliari è dimostrato dai bambini che hanno una mutazione del gene che codifica per HSD3B7. Questi bambini sviluppano una progressiva malattia del fegato che è caratterizzata da itterizia.

A seguito dell'azione di HSD3B7 gli intermedi procedono lungo due vie metaboliche che portano come prodotti finali acido chenodesossicolico (CDCA) ed acido colico (CA). La distribuzione di questi due acidi è determinata dall'attività di sterolo 12 $\alpha$ -idrossilasi (CYP8B1).

Gli acidi biliari primari, acido colico e chenodesossicolico, che sono prodotti nel fegato, vengono secreti nella bile principalmente sotto forma di sali sodici e coniugati con gli amminoacidi taurina e glicina; successivamente passano al duodeno attraverso le vie biliari. In questa zona dell'intestino tenue si esplica la principale azione fisiologica degli acidi biliari che è la capacità di permettere la digestione e l'assorbimento dei lipidi.

Nel lume intestinale una parte degli acidi biliari primari, tranne il 10-15%, viene deconiugata e deidrossilata per azione della flora batterica propria di questo apparato.

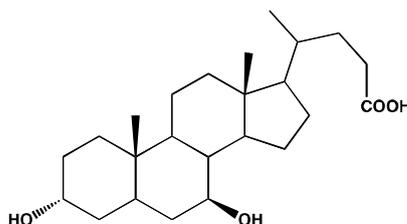
Queste reazioni portano alla formazione degli acidi biliari secondari: l'acido desossicolico e l'acido litocolico.

Questi vengono assorbiti come i precedenti a livello del digiuno prossimale e del colon con un meccanismo di trasporto passivo, mentre per i composti coniugati e a maggior numero di ossidrili il trasporto è, invece, mediato da carriers.

Dopo essere stati assorbiti dall'intestino, gli acidi biliari vengono riconvogliati al fegato dove subiscono diverse trasformazioni che producono gli acidi biliari terziari: ad esempio l'acido litocolico di cui è nota l'epatotossicità, viene solfato (diventando così acido sulfolitocolico) per aumentarne l'idrosolubilità e diminuirne così il riassorbimento.

Gli acidi biliari così trasformati sono riconiugati con taurina e glicina e secreti nella bile.

A livello intestinale vi sono ulteriori reazioni catalizzate dalla flora batterica come l'idrolisi dei coniugati e l'epimerizzazione in posizione C-7 (il sostituito da  $\alpha$  diventa  $\beta$ ) dell'acido chenodesossicolico che porta alla formazione dell'acido ursodesossicolico (Figura 9).



Acido ursodesossicolico

**Figura 9**

L'azione combinata degli enzimi epatici e della flora batterica determina per tanto la composizione finale degli acidi biliari.

## **Relazioni tra struttura e attività degli acidi biliari**

Nei vari comparti del circolo eteropatico, dove gli acidi biliari svolgono le funzioni fisiologiche di cui si è detto, la definizione delle loro proprietà chimico-fisiche appare un passo fondamentale per poter interpretare e comprendere eventi fisiologici farmacologici e patologici. E' evidente che esistono razionali e prevedibili correlazioni fra detergenza e capacità di trasporto dei lipidi, tra ionizzazione ed assorbimento intestinale, tra lipofilia ed assorbimento passivo degli acidi biliari stessi.<sup>6</sup>

L'approccio struttura-funzione non è sempre così automatico e non è sufficiente a spiegare completamente il metabolismo e la fisiologia degli acidi biliari poiché esistono altri meccanismi che influenzano la loro funzione come per esempio le loro proprietà regolatorie su enzimi epatici e i meccanismi di assorbimento epatico ed intestinale attivi e mediati da carrier specifici.

La relazione tra struttura e funzione degli acidi biliari deve tenere conto di una serie di complesse considerazioni già accennate precedentemente quali:

- gli acidi biliari sintetizzati dal colesterolo vengono immediatamente coniugati nel fegato con gli amminoacidi glicina e taurina e solo così secreti nella bile;
- gli acidi biliari vengono assorbiti dall'intestino con differenti meccanismi;
- gli acidi biliari vengono in parte deconiugati e 7-deossidrilati ad opera della flora batterica intestinale;
- gli acidi biliari interagiscono con l'albumina e con altre proteine vettrici sieriche e vengono captati nel fegato con un processo sia attivo che passivo.

Il quadro dinamico che si presenta vede gli acidi biliari primari, colico e chenodesossicolico, che vanno incontro ad una serie di biotrasformazioni ed il risultato è che in condizioni di equilibrio la bile contiene almeno 10 acidi biliari differenti le cui proporzioni relative sono diverse nel siero, nelle urine e nell'intestino.

La relazione tra funzione fisiologica e struttura passa attraverso la definizione delle proprietà chimico-fisiche più importanti. La biosintesi epatica dal colesterolo ad acido biliare trasforma completamente la struttura di questo steroide con formazione di una molecola anfipatica che possiede due distinte regioni, una idrofila e l'altra lipofila e ciò conferisce all'acido biliare le ben note proprietà "detergenti". Interessante dal punto di

vista chimico-fisico è definire l'area superficiale della molecola suddivisa in area "non carica" ed in area "carica" che tiene conto rispettivamente dello scheletro idrocarburico lipofilo della molecola e dei gruppi polari OH presenti in diverso numero, posizione ed orientamento. E' possibile quantificare i contributi dei singoli gruppi OH e predire alcune proprietà come la concentrazione macellare critica (CMC) e la lipofilia. L'anfipaticità degli acidi biliari consente la formazione di soluzioni micellari, cioè aggregati di molti monomeri, nei quali le parti lipofile della molecola vengono a contatto tra di loro eliminando acqua nel loro intorno. Le leggi dell'equilibrio chimico prevedono che tale fenomeno avvenga ad un ben definito ambito di concentrazione al di sotto del quale sono presenti solo monomeri mentre al di sopra la concentrazione degli acidi biliari aggregati in micelle aumenta molto di più di quella dei monomeri. Tale concentrazione è definita "concentrazione macellare critica" (CMC). Appare chiaro che nella regione non polare della micella sono solubilizzate sostanze insolubili in acqua come il colesterolo. All'interno degli acidi biliari diidrossilati la presenza di OH equatoriali ( $3\beta$ ,  $6\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $12\beta$ ), cioè orientati dalla parte lipofila della molecola, aumenta i valori di CMC riducendone quindi la detergenza come risultato di una ridotta area lipofila del piano  $\beta$  della molecola. La presenza di due OH vicinali come nel caso degli acidi iocolici diminuisce il contenuto dell'idrofilia rispetto ad OH in posizioni più lontane. La presenza di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  riduce notevolmente la CMC e aumenta le dimensioni delle micelle.<sup>5</sup>

Nel settore degli acidi biliari spesso si tende a generalizzare considerando sinonimi le parole lipofilia e detergenza, ma questo potrebbe portare ad un'interpretazione non corretta di molti fenomeni biologici. La detergenza è la capacità di formare micelle e così, come aggregati, gli acidi biliari, agiscono da detergenti o trasportatori di lipidi insolubili. La lipofilia è invece la tendenza a ripartirsi in ambiente lipidico, al contrario l'idrofilia è la tendenza a ripartirsi in acqua quando viene studiato un sistema costituito da due fasi immiscibili o comunque eterogenee (membrane).<sup>6</sup>

In generale le molecole lipofile tenderanno a formare più facilmente micelle e quindi saranno anche molto detergenti, ma esistono anche moltissimi casi in cui molecole lipofile sono poco detergenti come risultato di un'elevata lipofilia non opportunamente localizzata in una parte della molecola.

Per quanto riguarda l'acidità degli acidi biliari liberi e coniugati è possibile dire che questa non è influenzata dalla posizione e dall'orientamento dei gruppi OH ed il valore del pKa è rispettivamente 5 per i liberi<sup>7</sup> e 3.9 per i coniugati.<sup>8</sup>

Gli acidi biliari liberi e coniugati essendo acidi deboli possono essere presenti in soluzione acquosa sia in forma dissociata che indissociata. La prima è senz'altro la più solubile. La solubilità di un acido debole in generale aumenta con il pH, ma nel caso degli acidi biliari il sistema diviene più complesso poiché la forma dissociata (anione) forma micelle che aumentano notevolmente le solubilità sia dell'anione che si aggrega, sia della forma indissociata che viene solubilizzata all'interno della micella stessa. Per ottenere valori di solubilità in funzione della struttura bisogna quindi parlare di solubilità della forma protonata.<sup>8</sup>

## Alterazioni delle funzioni biliari

Gli acidi biliari dunque, rappresentano il prodotto terminale del metabolismo epatocitario del colesterolo proveniente dalla dieta o sintetizzato ex-novo dalle cellule epatiche o durante il metabolismo dei grassi. Le cellule epatiche producono mediamente un grammo al giorno di acidi biliari che sono secreti nella bile sotto forma di sali sodici.

La bile, prodotta continuamente dalle cellule epatiche, è secreta per mezzo di minuscoli canalicoli detti *canalicoli biliari* che si trovano in mezzo al doppio strato cellulare delle placche epatiche, da dove la bile scorre perifericamente in direzione dei *dotti biliari terminali* giungendo a dotti via via più grandi fino ad arrivare al *dotto epatico* e di qui al *coledoco*. In questo distretto la bile si svuota direttamente nel duodeno o è deviata nella colecisti.

La quantità di bile prodotta è compresa fra i 600 e gli 800 ml/di, mentre la capacità massima della colecisti è di appena 40-70 ml. Ciononostante la secrezione biliare di almeno 12 ore può essere immagazzinata nella colecisti grazie al fatto che H<sub>2</sub>O, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e gli altri elettroliti presenti sono continuamente assorbiti dalla mucosa colecistica. Si assiste quindi ad una concentrazione di tutti i costituenti della bile compresi i sali biliari, il colesterolo e la bilirubina. In questo modo la bile può essere concentrata da 5 a 10 volte.

Due sono le condizioni necessarie per avere lo svuotamento della colecisti:

- Rilassamento dello sfintere di Oddi per consentire alla bile il deflusso dal coledoco in direzione del duodeno.
- Contrazione della colecisti stessa per forzare il passaggio della bile nel coledoco.

Entrambe queste condizioni si verificano al termine di un pasto in particolar modo se è stata ingerita un'alta quantità di grassi. Il meccanismo di secrezione è indotto nel modo seguente:

- a) Il grasso alimentare entrando nell'intestino estrae dalla mucosa intestinale, in particolare da quella dei segmenti più alti del tenue, un ormone detto *Colecistochinina*. Questo, assorbito nel torrente circolatorio, raggiunge la colecisti provocandone una contrazione parietale tale da originare la pressione necessaria a spingere la bile in direzione del duodeno.<sup>9</sup> L'attivazione di una stimolazione vagale connessa con la fase cefalica della secrezione gastrica o con diversi riflessi

intestinali, è in grado di promuovere un'altra debole ma significativa contrazione colecistica.

- b) Quando la colecisti si contrae si ha, per riflesso neurogeno o miogeno, una contrazione dello sfintere di Oddi.
- c) La presenza del bolo alimentare nel duodeno fa aumentare l'attività peristaltica della parete tanto da produrre ritmici rilasciamenti dello sfintere di Oddi con conseguente passaggio di bile in direzione del duodeno (fenomeno che prende il nome di rilasciamento recettivo).

Quando il pasto è privo di grassi la colecisti si svuota in misura molto modesta, ma in presenza di adeguate quantità di grassi si può avere svuotamento in circa un'ora.

Circa il 94% dei sali biliari è riassorbito dalla mucosa intestinale a livello del digiuno prossimale e del colon con un meccanismo passivo. Nell'ileo distale si assiste ad un meccanismo di assorbimento attivo carrier-mediato che coinvolge in particolar modo i composti coniugati e quelli con un maggior numero di ossidrili. Dopo il passaggio attraverso la mucosa i sali biliari si staccano dai lipidi passando nei vasi portali, mentre i grassi seguono la via dei vasi linfatici. A livello del fegato i sali biliari sono prelevati dal sangue nei sinusoidi, riassorbiti nelle cellule epatiche da dove opportunamente coniugati sono rimessi in circolo nella bile.

Questi sali ripetono l'intero percorso circa 18 volte, prima d'essere escreti attraverso le feci. Le aliquote perse per via fecale sono rimpiazzate dalla continua produzione che viene fatta ad opera del fegato. Il movimento degli acidi biliari all'interno dell'apparato digerente è noto come *Circolo Enteroepatico*.

I sali biliari esplicano due importanti funzioni nel tubo digerente:

**Funzione Emulsionante:** grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche esercitano sui grassi di origine alimentare un'azione di tipo detergente, ossia abbassandone la tensione superficiale, fanno sì che durante la fase di rimescolamento del bolo nell'intestino essi si frammentino in minuscole goccioline di grasso.

**Funzione Idrotropica:** consiste nella capacità che i sali biliari hanno di favorire l'assorbimento intestinale degli acidi grassi, dei monogliceridi, del colesterolo e di altri lipidi.

Si ritiene che gli ioni dei sali biliari vengano adsorbiti fisicamente dai lipidi e che presumibilmente le cariche elettriche aumentino la solubilità dei lipidi, consentendone il rapido passaggio attraverso la mucosa intestinale.<sup>9</sup>

I disturbi legati ad un'alterazione della funzionalità biliare sono fondamentalmente di due tipi:

- **Carenza di Acidi Biliari:** tale deficit a livello intestinale può, nei casi gravi, provocare una perdita del 40% dei grassi ingeriti, attraverso le feci; in tal caso, il soggetto va incontro a deficienze metaboliche. Peraltro in difetto di un adeguato assorbimento di grassi, anche le vitamine liposolubili non vengono assorbite in modo soddisfacente. Si possono rilevare in tal caso una carenza nell'assunzione di vitamine A, D, E, K. Le vitamine A, D, E si trovano depositate nell'organismo in grande quantità. Ciò non è purtroppo vero per la vitamina K; infatti, bastano pochi giorni di sospensione della secrezione biliare perché si manifesti una carenza di tale vitamina nell'organismo. Tale insufficienza provoca una scarsa produzione epatica di protrombina e di fattore VII con compromissione del processo di coagulazione del sangue.
- **Formazione di Calcoli Biliari:** durante il processo di secrezione degli acidi biliari circa il 10 % del colesterolo viene eliminato con la bile. Non sembra che il colesterolo presente nella bile abbia alcuna funzione e si ritiene che rappresenti semplicemente un prodotto intermedio della biosintesi dei sali biliari.

Il colesterolo è quasi insolubile in acqua, ma i sali biliari, gli acidi grassi e le lecitine presenti nella bile esercitano un effetto idrotropo rendendo solubile il colesterolo. Man mano che la bile si viene concentrando nella cistifellea, tutte le sostanze ad azione idrotropa si concentrano assieme al colesterolo facendolo permanere in soluzione. Tuttavia se il colesterolo è presente in elevate concentrazioni può precipitare portando alla formazione di calcoli biliari.

Tra le condizioni che possono determinare la precipitazione del colesterolo sono da ricordare:

- Eccessivo assorbimento di acqua dalla bile
- Eccessivo assorbimento di sali biliari, acidi grassi e lecitine dalla bile stessa
- Eccessiva secrezione di colesterolo nella bile
- Stati infiammatori dell'epitelio della colecisti

La quantità di colesterolo nella bile è, in parte, determinata dalla quantità di grassi assunti dalla dieta poiché esso è uno dei prodotti principali del metabolismo lipidico operato dagli epatociti. Perciò i soggetti che per molti anni della loro esistenza si alimentano con diete ricche di grassi sono da considerarsi a rischio di insorgenza di calcolosi biliare. L'inflammatione dell'epitelio colecistico determina spesso un certo grado di infezione cronica; ciò altera le proprietà assorbenti della mucosa che può favorire un eccessivo assorbimento di acqua, sali biliari e altre sostanze, che servono a mantenere il colesterolo in soluzione. Conseguentemente il colesterolo comincia a precipitare dando luogo alla formazione di numerosi piccoli cristalli che vanno a depositarsi sulla mucosa infiammata. Questi a loro volta, agiscono come centri per un'ulteriore precipitazione di colesterolo aumentando progressivamente le loro dimensioni.

Talvolta si assiste alla formazione di un gran numero di calcoli d'aspetto sabbioso, ma il più delle volte si ha una loro coalescenza, con formazione di pochi grossi calcoli o persino di un unico calcolo che occupa l'intera colecisti.<sup>9</sup>

## **Caratteristiche farmacologiche degli acidi biliari**

Fino agli anni '70 l'unico trattamento terapeutico contro i calcoli biliari era rappresentato dall'intervento chirurgico. In certi paesi ancora si utilizza prevalentemente questo trattamento, ad esempio in Ecuador, dove questa malattia ha una forte presenza per un'alimentazione ricca in grassi.

Oggi invece, molti pazienti vengono trattati con terapia a base di acido chenodesossicolico e acido ursodesossicolico poiché alcune ricerche hanno dimostrato che i calcoli biliari vengono solubilizzati se vengono a contatto con queste sostanze.

L'acido ursodesossicolico è il 7 $\beta$ -epimero dell'acido chenodesossicolico e rappresenta una piccola percentuale degli acidi biliari totali presenti fisiologicamente nella bile umana.

Questo acido è in grado di aumentare nell'uomo la capacità di solubilizzare il colesterolo nella bile trasformandola da bile litogena a bile non litogena.

I meccanismi attraverso cui si manifesta questo effetto farmacologico sono più di uno:

- Diminuzione della secrezione di colesterolo nella bile, dovuta alla riduzione della sintesi epatica del colesterolo stesso e del suo assorbimento a livello intestinale;
- Aumento della quantità complessiva di acidi biliari che favoriscono la solubilizzazione micellare del colesterolo;
- Formazione di una mesofase liquido-cristallina che permette di solubilizzare il colesterolo in modo più efficiente rispetto alla solubilizzazione ottenibile in fase di equilibrio.

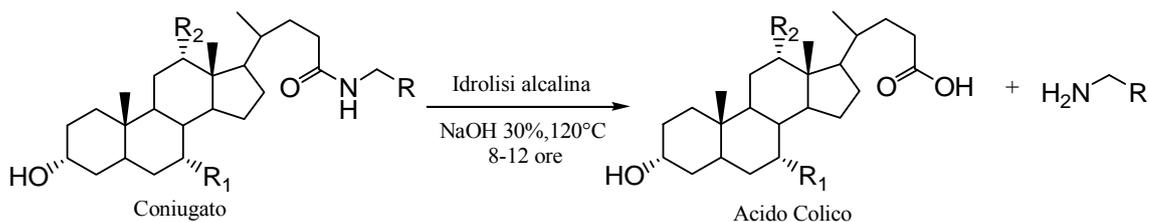
L'acido ursodesossicolico viene considerato di maggior importanza farmacologica rispetto all'acido chenodesossicolico nella terapia contro la calcolosi biliare, in quanto possiede elevata efficacia e totale assenza di effetti collaterali.

L'acido ursodesossicolico è un principio attivo molto costoso in quanto, a tutt'oggi, si può ottenere dalla bile dell'orso (pratica utilizzata nella medicina tradizionale cinese) e dall'acido colico e chenodesossicolico di origine bovina attraverso reazioni chimiche caratterizzate da alti costi ed elevato impatto ambientale.

La necessità di produrre ingenti quantità di acido ursodesossicolico ha portato alla messa a punto di metodologie di sintesi che utilizzano come prodotti di partenza sali coniugati della bile bovina di minor valore come i taurinati e i glicinati dell'acido colico e chenodesossicolico.

L'acido colico é il principale costituente della bile bovina ed é il principale substrato di partenza per la sintesi dell'acido ursodesossicolico, principio attivo di interesse farmacologico.

La bile viene inizialmente sottoposta ad idrolisi alcalina per rilascio degli acidi biliari che fisiologicamente si trovano coniugati a taurina e glicina: questa reazione richiede l'impiego di grosse quantità di NaOH (30%) ed alte temperature (120°C) per tempi estremamente lunghi (8-12 ore) (Schema 4).

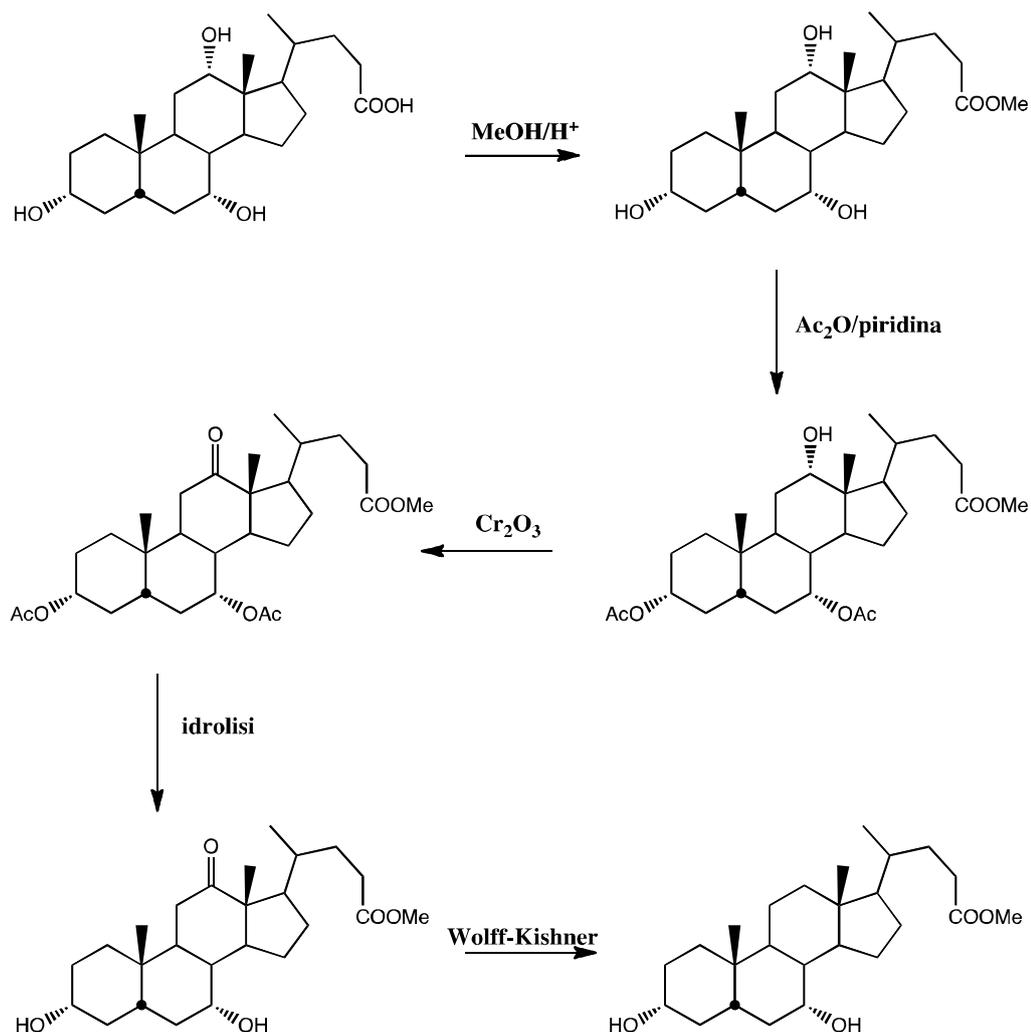


**Schema 4**

Per la sintesi chimica di acido chenodesossicolico e da questo dell'acido ursodesossicolico negli anni '50 Fieser e Hofman, hanno messo a punto una metodologia in cinque step.<sup>10,11</sup>

La sintesi dell'acido chenodesossicolico dall'acido colico (Schema 5) prevede i seguenti stadi:

- 1) Esterificazione con metanolo e conseguente formazione di metilcolato;
- 2) Acetilazione regioselettiva con piridina e anidride acetica degli ossidrili in posizione C-3 e C-7 (protezione di gruppi funzionali);
- 3) Ossidazione in C-12 con CrO<sub>3</sub>;
- 4) Idrolisi degli esteri metilico e acetilici;
- 5) Riduzione di Wolff-Kishner per ottenere l'acido chenodesossicolico.

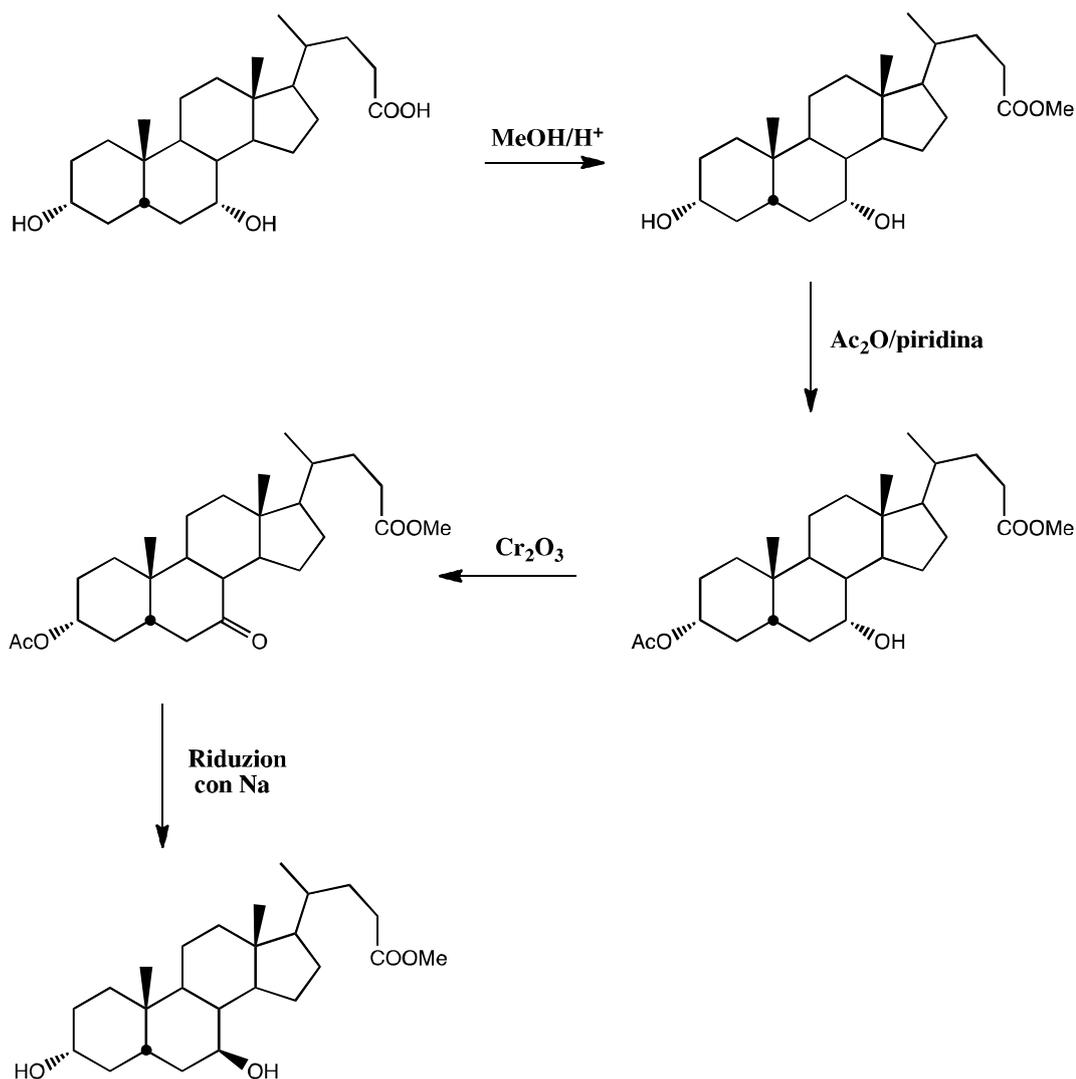


### Schema 5

Partendo dall'acido chenodesossicolicò é possibile ottenere l'acido ursodesossicolicò mediante inversione selettiva  $\alpha/\beta$  dell'ossidrilè in posizione C-7.

Questa conversione (Schema 6) richiede varie reazioni simili alle precedenti:

- 1) Esterificazione con metanolo e formazione di metilchenossicolato;
- 2) Acetilazione regioselettiva con piridina e anidride acetica dell'ossidrilè in posizione C-3;
- 3) Ossidazione in C-7 con  $\text{CrO}_3$ ;
- 4) Riduzione stereoselettiva del gruppo chetonico in C-7 con Na.



**Schema 6**

Si può notare come la sintesi organica per l'ottenimento di acido chenodesossicolico e acido ursodesossicolico a partire da taurinati e glicinati dell'acido colico, sia un processo lungo, complicato e rischioso a causa della natura e della tossicità dei reagenti utilizzati, basti pensare alle spese di smaltimento delle grosse quantità di NaOH, sali di cromo e solventi organici o ai processi di purificazione necessari per eliminare i sottoprodotti che si formano ad ogni step di reazione.

Tutto ciò allunga i tempi, aumenta i costi e diminuisce le rese di produzione. Per questi motivi, oggi, la ricerca é orientata verso metodologie di sintesi più economiche, non inquinanti e sicure per gli operatori.

Un approccio che sembra promettere grandi risultati é quello delle biotrasformazioni con microrganismi non patogeni, di facile gestione, e dei loro enzimi. Questo lavoro di tesi si inserisce in tale ambito rappresentando una parte di un più ampio lavoro di screening rivolto all'individuazione di batteri in grado di catalizzare reazioni di interesse industriale nelle molecole steroidee.

## Le Biotrasformazioni

Nell'ambito delle "biotecnologie bianche", impiegate nel campo alimentare oppure medico, si sfrutta la capacità dei microorganismi di trasformare un substrato di partenza in un prodotto di interesse industriale. È necessario fare alcune distinzioni tra i vari tipi di modificazioni che un substrato può subire. In particolar modo bisogna distinguere tra bioconversioni, biodegradazioni e le biotrasformazioni. Le due prime prevedono una sintesi *ex novo* di prodotti relativamente complessi catalizzata da cellule, tessuti, organi o microorganismi, partendo da composti strutturalmente molto semplici come ad esempio l'anidride carbonica, l'ammoniaca o il glucosio. Le biodegradazioni consistono in processi catabolici che tendono a ricondurre le sostanze organiche a sostanze inorganiche.<sup>12</sup>

Se si parla di biotrasformazioni si parla del processo nel quale un biocatalizzatore (microorganismo o enzima purificato) utilizzato in un processo fermentativo modifica, o meglio biotrasforma, una molecola che può essere un normale costituente del brodo di coltura o una molecola estranea ad esso (ad esempio un sottoprodotto di lavorazione): questa seconda possibilità è molto interessante dal punto di vista industriale.

I vantaggi che derivano nell'utilizzo di queste particolari trasformazioni rispetto ad una classica sintesi chimica sono molte. Trattandosi di processi che sfruttano organismi viventi, vengono garantite condizioni di reazione diverse rispetto ad una sintesi chimica (di solito più blande) e con bassissimo impatto ambientale.

### I biocatalizzatori

I biocatalizzatori che si utilizzano nelle biotrasformazioni sono enzimi e microorganismi, che possono essere considerati come sistemi multi enzimatici. I microorganismi e gli enzimi possono essere utilizzati in soluzione o immobilizzati. La scelta del biocatalizzatore viene condizionata da una serie di fattori, quali:

- a) *il tipo di reazione;*
- b) *i cofattori che devono essere riciclati;*
- c) *la scala in cui la biotrasformazione deve essere condotta.*

Nonostante queste differenze, gli enzimi e le cellule hanno in comune la capacità di catalizzare reazioni con un alto livello di specificità. Quindi, nel momento in cui si progetta

un processo di biotrasformazione si rende necessario indirizzare la scelta sull'utilizzo di enzimi isolati oppure su cellule intere. Nella Tabella 1 vengono evidenziati i vantaggi e gli svantaggi di entrambi i metodi.

**Tabella 1.** Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo di enzimi e cellule

<b>Sistema</b>	<b>Forma</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
Enzima isolato	Come tale	Apparecchiatura e lavorazione semplice, miglior produzione dovuta alla capacità di tollerare alte concentrazioni	Necessario il riciclo del cofattore
	Sciolto in acqua	Alta attività dell'enzima	Reazioni collaterali Substrati lipofilici e insolubili, estrazione
	Sospeso in solvente organico	Facilità di reazione Substrati lipofilici solubili, facile recupero dell'enzima	Bassa attività
	Immobilizzato	Facile recupero dell'enzima	Perdita di attività durante immobilizzazione
Cellule	Come tali	Non necessario il riciclo del cofattore	Equipaggiamento costoso, basse tolleranze ad alte concentrazioni e a solventi organici, reazioni collaterali dovuto al metabolismo
	Colture in crescita	Attività più alta	Più prodotti collaterali
	Cellule cresciute	Facile lavorazione Pochi prodotti collaterali	Attività più bassa
	Cellule immobilizzate	Possibilità di riciclaggio delle cellule	Attività più bassa

Se da un lato l'impiego di cellule intere risolve il problema dell'aggiunta di cofattori alla reazione, dall'altro richiede personale con esperienza sia in campo microbiologico sia nell'utilizzazione di apparecchiature di fermentazione. Ogni cellula contiene qualche migliaio di enzimi diversi e sono tutti necessari per il suo corretto funzionamento.

L'impiego di enzimi isolati invece, è limitato dalla loro disponibilità commerciale, dal loro costo e dalla loro possibile perdita di attività nel tempo. Nonostante siano i migliori catalizzatori per la produzione di composti con un alto livello di purezza e che il numero di quelli identificati sia elevato, il loro impiego su scala industriale è minimo visti i costi elevati di purificazione e la necessità di utilizzare cofattori.

Possiamo affermare che un biocatalizzatore permette di ottenere:

- **Efficienza catalitica:** la velocità di reazione aumenta di molto rispetto all'utilizzo di catalizzatori chimici tradizionali;
- **Blande condizioni di reazione:** i biocatalizzatori lavorano in un intervallo di pH che è prossimo alla neutralità e a temperature di 20-40°C;
- **Basso impatto ambientale:** i biocatalizzatori vengono utilizzati in concentrazioni molto basse e sono biodegradabili;
- **Elevata selettività:** è la caratteristica più importante per quanto il biocatalizzatore è in grado di effettuare reazioni altamente selettive. In particolare possiamo avere reazioni chemo-, regio- ed enantioselettive.

In particolare si intende per **chemoselettività** la capacità di reagire solo con un solo gruppo funzionale, qualora ne siano presenti diversi nel substrato che possono dare la stessa reazione, per **regioselettività** la capacità di distinguere due o più gruppi funzionali uguali situati in regioni diverse della molecola substrato e per **stereoselettività** la capacità di trasformare un composto achirale in un unico stereoisomero di un composto chirale o di reagire con un solo isomero della miscela di stereoisomeri.

Sono definiti come stereoisomeri, i composti isomerici in cui i legami tra gli atomi sono gli stessi ma differiscono per la loro disposizione nello spazio. Gli stereoisomeri sono distinti in enantiomeri e diastereoisomeri.

Enantiomeri sono definiti come coppie di molecole che esistono come immagini speculari l'una dell'altra, non sovrapponibili. Perché si verifichi questo è necessaria la presenza di un atomo di carbonio legato a quattro atomi o gruppi sostituenti diversi (assenza di elementi di simmetria): questo carbonio viene detto chirale e la molecola esiste in coppia enantiomerica. Gli enantiomeri hanno le stesse caratteristiche chimico-fisiche ma differiscono per il potere ottico rotatorio (isomeri ottici) e per la velocità con cui reagiscono con altre molecole otticamente attive.

I diastereoisomeri invece sono stereoisomeri che non sono sovrapponibili e non sono nemmeno l'immagine speculare l'uno dell'altro. A differenza degli enantiomeri, i diastereoisomeri sono molecole diverse dotate di proprietà chimico-fisiche diverse e quindi possono essere facilmente separati.

### **Processi di Biotrasformazione**

Nella realizzazione di un processo biotrasformativo si rendono necessari tre requisiti fondamentali:

- 1) **La coltura deve contenere gli enzimi necessari** per la trasformazione del precursore in prodotto.
- 2) **Il prodotto si deve formare rapidamente** senza essere metabolizzato.

La produzione di un metabolita secondario o la biotrasformazione di un substrato può andare incontro ad alcuni problemi operativi. In alcuni casi, al raggiungimento di una determinata concentrazione di prodotto, si rischiano effetti di feed-back negativi o, peggio ancora, effetti tossici nei confronti delle colture. Altro problema che può vedersi è che il prodotto desiderato venga ulteriormente trasformato in altre sostanze non utili: è quindi necessario attuare strategie che permettono una raccolta del prodotto sottraendolo alla coltura o bloccando i processi metabolici implicati in una sua ulteriore trasformazione.

L'aggiunta di precursori o di intermedi metabolici che favoriscono la produzione di una determinata sostanza può essere una strategia che porta all'ottimizzazione di un modello biotecnologico. Occorre però prestare attenzione che questi precursori non inneschino un'inibizione a feed-back o effetti tossici sulle colture.

Altro aspetto importante di un processo biotrasformativo è la scelta dei biocatalizzatori. In questo ambito le considerazioni da fare sono molteplici:

- ***Biotrasformazioni con colture in crescita:*** il substrato viene aggiunto al mezzo di coltura al momento dell'inoculo;
- ***Biotrasformazioni con cellule già cresciute (resting cells):*** dopo la fase di crescita, le cellule vengono centrifugate per separarle dal mezzo di coltura e successivamente risospese in una soluzione acquosa o tampone nella quale viene aggiunto il substrato;

- ***Biotrasformazioni con cellule immobilizzate:*** metodo simile al precedente con la differenza che le cellule non vengono risospese ma vengono immobilizzate su di una matrice (ad esempio gel di poliacrilammide);
- ***Biotrasformazioni con spore:*** nel caso in cui si utilizzi un fungo come vettore biotrasformativo, le spore isolate dal micelio vengono utilizzate come biocatalizzatori<sup>13</sup> in quanto possiedono enzimi importanti sia durante la fase vegetativa che durante la germinazione;
- ***Biotrasformazioni con enzimi extracellulari o purificati:*** il substrato viene aggiunto agli enzimi semplicemente separati dalle cellule o completamente purificati, in soluzione o immobilizzati su supporti polimerici.

Un altro punto, non meno importante, da considerare in un processo di biotrasformazione, sono le caratteristiche che il substrato da utilizzare possiede. Il substrato, infatti, deve essere dotato di una buona lipofilia per attraversare le membrane cellulari e deve presentare una certa solubilità in fase acquosa, può essere aggiunto puro o sciolto in un opportuno solvente organico miscibile con l'acqua come etanolo, acetone, glicole propilenico, dimetilsolfossido, dimetilformammide, fino a raggiungere la concentrazione di 1-2 g/l, rispettando i limiti di tossicità che tali solventi possono indurre nell'organismo utilizzato.

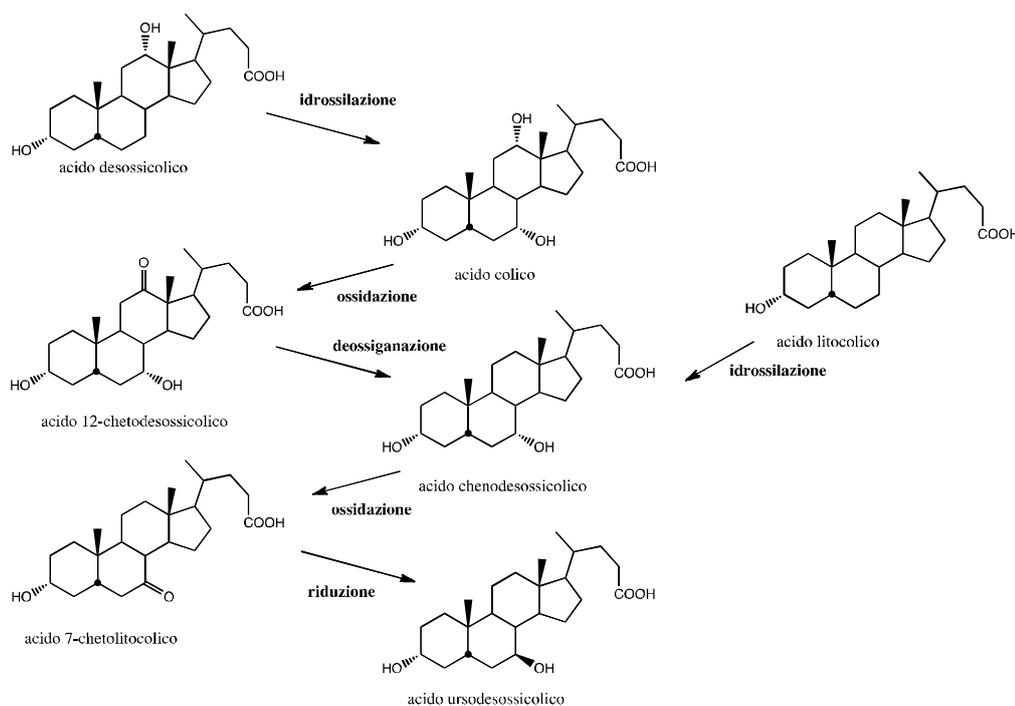
## Le biotrasformazioni degli acidi biliari

L'acido ursodesossicolico, principio attivo che viene utilizzato a livello farmaceutico per le sue proprietà di solubilizzare calcoli biliari di colesterolo, è oggi sintetizzato per via chimica come precedentemente descritto.

La sintesi chimica comporta una serie di reazioni, la maggior parte delle quali consistono in ossidazioni e riduzioni, che hanno un forte impatto ambientale.

Interessante, in questo ambito, è la ricerca di microrganismi ed enzimi in grado di trasformare in maniera selettiva le varie funzioni ossidriliche dell'anello steroidico.

Le reazioni microbiologiche ed enzimatiche più studiate, a carico degli acidi biliari e dei loro coniugati, sono quelle spendibili nella conversione dei vari acidi biliari presenti nella bile bovina e suina (ad esempio acido colico, acido desossicolico ed acido iodesossicolico) in acido chenodesossicolico e acido ursodesossicolico. Le reazioni che permettono queste trasformazioni sono quelle di idrolisi, epimerizzazione, ossidazione, riduzione, idrossilazione e deidrossilazione. In linea di principio possiamo evidenziare alcune reazioni fondamentali che portano alla sintesi dell'acido chenodesossicolico partendo dall'acido colico quali l'ossidazione selettiva della funzione 12-OH e la successiva deossigenazione (Schema 7).



**Schema 7**

La capacità dimostrata da molti batteri di idrolizzare il legame ammidico dei coniugati è probabilmente legata ad un meccanismo di detossificazione<sup>14,15</sup> e può essere utilizzata in alternativa all'idrolisi basica per l'ottenimento di acidi biliari liberi.

**Epimerizzazione.** I processi di epimerizzazione, principalmente a carico delle funzioni ossidriliche, sono stati molto studiati in quanto consentono la produzione di 3 $\beta$ - ed in particolare 7 $\beta$ -idrossi acidi biliari (come l'acido ursodesossicolico). Possono avvenire sia per via ossido-riduttiva, avendo come intermedi i corrispondenti chetoderivati,<sup>16</sup> sia mediante deidrossilazione e conseguente  $\beta$ -idrossilazione.<sup>17</sup> Gli enzimi coinvolti in queste reazioni sono, nel primo caso, 7 $\alpha$  e 7 $\beta$  idrossisteroidi deidrogenasi NAD(P)<sup>+</sup>-dipendenti mentre nel secondo caso si tratta di 7 $\alpha$ -idrossisteroidi deidrossilasi assieme a 7 $\beta$ -idrossisteroidi idrossilasi. Altri importanti enzimi ossido-riduttivi sono le deidrogenasi NADH- o NADPH-dipendenti in grado ossidare e ridurre regioselettivamente la posizione C-12 dell'acido colico.<sup>18</sup>

Viene riportata in letteratura l'epimerizzazione del gruppo ossidrilico presente in posizione C-7 degli acidi colico e chenodesossicolico ai corrispondenti acido ursocolico e ursodesossicolico in presenza di basse concentrazioni di ossigeno. Tale trasformazione è catalizzata da *Xantomonas maltophilia* CBS 827.97.<sup>16</sup>

**Ossidazione.** Le reazioni di ossidazione si caratterizzano per un cambiamento nello stato di ossidazione e di solito procedono attraverso l'eliminazione (ossidazione) di una molecola di idrogeno. Nella sintesi di acido ursodesossicolico (UDCA), ad esempio, le reazioni di ossidazione maggiormente studiate sono quelle che coinvolgono la posizione C-7 e C-12, e permettono di ottenere composti chiave come l'acido 12-chetochenodesossicolico e 7 chetolitocolico.

La deidrogenazione del gruppo 7 $\alpha$ -OH dell'acido colico (CA) e dell'acido chenodesossicolico (CDCA) è stata osservata sia in colture microbiche miste provenienti da feci umane sia in ceppi batterici isolati.<sup>19</sup> D'altra parte, i ceppi che si sono dimostrati efficienti nella 7 $\alpha$ /7 $\beta$ -epimerizzazione della funzione idrossilica via 7 $\alpha$ -deidrogenazione quali *B. fragilis* e *uniformis*, *Escherichia coli*, e *Clostridium absonum*, vengono utilizzati nell'ossidazione della posizione 7-OH.

Sospensioni di cellule di *Clostridium bifermentans* sono state incubate con acido colico in varie condizioni anche nel tentativo di modificare la competizione tra le reazioni di 7 $\alpha$ -

deidrogenazione e  $7\alpha$ -deidrossilazione.<sup>20</sup> In presenza di acido etilendiamminotetracetico (EDTA) si ottiene quasi quantitativamente il prodotto di ossidazione. Anche la presenza di aria favorisce l'ossidazione probabilmente attraverso un effetto sul potenziale redox del mezzo.

L'ossidazione della funzione ossidrilica in C-12 dell'acido desossicolico (DCA) si ottiene con *Arthrobacter simplex*<sup>21</sup> anche se in miscela con il corrispondente 3,7-dicheto derivato. Data l'importanza industriale dell'ossidazione dell'acido colico in C-12, molti brevetti sono stati depositati su questo argomento.<sup>22</sup>

Recentemente microrganismi, isolati da campioni prelevati in una ditta (ICE srl, Reggio Emilia) che estrae e purifica acidi biliari da matrici naturali, hanno permesso di ossidare regioselettivamente la posizione C-7 dell'acido colico, dell'acido chenodesossicolico e dell'acido iocolico e la posizione C-12 dell'acido desossicolico, in particolare.<sup>18</sup> Ossidazione regioselettiva della posizione C-3 con rese eccellenti si ottiene per incubazione di vari acidi biliari come CA, DCA, CDCA e UDCA con *Pseudomonas paucimobilis* (Bianchini et al., 1999).<sup>23</sup>

**Riduzione.** Una delle reazioni di riduzione più interessanti è quella che permette la conversione dell'acido deidrocolico (DHCA) in 12-chetochenodesossicolico attraverso l'acido 7,12-dichetolitolocolico come intermedio: le rese sono comprese tra 50% e 55% con *Brevibacterium fuscum* e *Lactobacillus xylosus*, batteri isolati dal suolo.<sup>24</sup>

**Idrossilazioni.** Le idrossilazioni rappresentano una delle più diffuse tipologie di biotrasformazioni che vengono ricercate nel campo degli steroidi. Sono estremamente importanti perché permettono di inserire un gruppo ossidrilico in posizioni poco reattive della molecola rendendo possibile la preparazione di importanti intermedi per sintesi chimiche oppure trasformando direttamente il prodotto di partenza in uno steroide bioattivo. Sono state riportate in letteratura idrossilazioni microbiche delle posizioni che vanno da C-1 a C-21 e in posizione C-26.

Le idrossilazioni nelle posizioni  $11\alpha$ ,  $11\beta$ ,  $15\alpha$  e  $16\alpha$  sono biotrasformazioni attualmente trasferite su scala industriale per la produzione di ormoni corticosurrenali e dei loro analoghi. Le idrossilazioni nelle posizioni  $11\alpha$ ,  $11\beta$ , e  $16\alpha$  sono solitamente eseguite utilizzando rispettivamente *Rhizopus* spp. o *Aspergillus* spp., *Curvularia* spp. o *Cunninghamella* spp. e *Streptomyces* spp.<sup>25</sup>

**Deidrossilazione.** La  $7\alpha$ -deidrossilazione degli acidi biliari primari CA e CDCA per produrre i corrispondenti acidi biliari secondari, acido desossicolico e acido litocolico, è considerata una delle più importanti biotrasformazioni di questa classe di composti sempre vista nell'ottica di una successiva idrossilazione che porta ad epimerizzazione della posizione C-7. Interessante è anche la deidrossilazione in C-12 dell'acido colico verso l'acido chenodesossicolico.

Colture pure di batteri sono stati isolati dalla flora intestinale umana e sottoposte a screening per la loro capacità di rimuovere il 7-OH del CA . E 'stato riportato che solo pochi ceppi sono in grado di deidrossilare CA in posizione C-7.<sup>26</sup> In particolare, tale attività è stata osservata in *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium*, e in molti ceppi di *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus* ma non in *Bifidobacterium*.<sup>27</sup>

## **I macelli in Ecuador: gestione della bile ed impatto ambientale**

L'Ecuador è un paese che si trova nella parte nord della costa occidentale del Sud America, ha una superficie di 256.370 km<sup>2</sup> e 13.810.000 abitanti. Le lingue ufficiali sono lo spagnolo e il quechua.

E' un paese di contrasti, con quattro regioni geografiche naturali: la costa, le montagne, la giungla e le isole Galapagos e per quello che l'Ecuador è considerato come uno dei paesi della mega biodiversità in tutto il mondo.

Secondo i dati del censimento della popolazione l'analfabetismo è diminuito sensibilmente a partire dagli anni Sessanta, ma rappresenta ancora un problema rilevante, soprattutto nelle zone rurali. I processi migratori interni portano le popolazioni rurali a lasciare la campagna e ad andare verso le principali città.

I processi di produzione alimentare sono ancora gestiti in maniera tradizionale e questo include la macellazione degli animali. I macelli in particolare hanno un basso livello di controllo microbiologico sulle aree interne e spesso gli scarti vengono eliminati nei fiumi che attraversano la città. I macelli visitati e che sono descritti in questa tesi hanno strutture di base per il processo di macellazione, ma non per l'immagazzinamento della carne. I rifiuti sono raccolti in contenitori di plastica e poi venduti.

Dato che uno degli obiettivi di questa ricerca è l'isolamento di microrganismi in grado di biotrasformare gli acidi biliari, sono state considerate aree come queste descritte, in cui la presenza delle viscere di bovini, suini e ovini hanno permesso lo sviluppo e l'adattamento di microrganismi che potrebbero essere attivi nelle biotrasformazioni degli acidi biliari. Viene presentata la modalità di macellazione dei vari macelli presi in considerazione e la movimentazione dei rifiuti prodotti nel processo.

L'Ecuador è un paese agricolo e vi sono tipi diversi di allevamento di bestiame a seconda delle regioni:

- Regione interandina: bovini per la produzione del latte
- Costa e Amazonia: bovini destinati alla produzione di carne
- Regione Inter-andina: bovini per la produzione di latte

Nel paese esistono leggi, agenzie di regolamentazione e di controllo per la garanzia di qualità e salute ambientale, ma tuttavia, ci sono lacune nella gestione integrata dei rifiuti da

macellazione tali da rendere ancora lontano l'obiettivo di essere compatibili con le esigenze della salute pubblica e dell'ambiente.

Secondo il terzo censimento agricolo nazionale, l'Ecuador ha una popolazione di circa 4.5 milioni di bovini, di cui il 37% sulla costa. I diversi macelli del paese registrano più di mezzo milione di bovini macellati ogni anno, con una produzione stimata di circa 105.430 tonnellate di carne (SICA, 2002).<sup>28</sup> Il 3% degli allevamenti di bestiame utilizza sistemi moderni in Canar, Guayas, Manabi e Pichicha, il 10% hanno procedure semitecnologiche mentre l'87% sono artigianali (CIB, 2002).<sup>29</sup>

Il processo di macellazione è un'attività che deve essere condotta con principi igienici per ottenere carne per il consumo umano ed un insieme di procedure che vanno dal ricevimento delle diverse specie animali fino alla commercializzazione dei prodotti ottenuti.

I macelli comunali sono società che generano una serie di rifiuti solidi organici, che causano gravi problemi ambientali alle risorse idriche, al suolo e all'aria.

Il 20-50% di un animale macellato, a seconda del tipo di animale, non è adatto al consumo umano; la maggior parte sono rifiuti putrescibili che devono essere maneggiati con cura per evitare odori e diffusione di malattie. Tutti questi rifiuti, ad eccezione delle feci generate nel trasporto, stoccaggio e abbattimento degli animali potrebbero essere usati e questo ridurrebbe considerevolmente la produzione di rifiuti solidi.

L'Ecuador ha più di 200 macelli: il 45% sono situati in montagna, il 38% sulla costa e il 17% in Amazzonia e Galapagos.

La maggior parte sono di proprietà e gestiti da comuni; l'81% dei macelli si trovano in aree urbane, il 7% in un contesto semi-urbano e il 12% nelle aree rurali.

In Ecuador la maggior parte dei macelli sono tradizionali. I volumi di macellazione variano da 5 animali fino a 400 animali al giorno.

In questi mattatoi spesso mancano le condizioni tecniche adeguate e i protocolli igienici che influenzano direttamente la qualità sanitaria delle carni che vengono processate.

Normalmente i mattatoi si trovano all'interno della città e causano gravi problemi di inquinamento ambientale.

I bovini sono senza dubbio tra gli animali maggiormente consumati a livello alimentare, oltre a ciò vengono utilizzati per la produzione di pellami e i prodotti di scarto, derivanti dalla macellazione, possono essere utilizzati in ambito farmaceutico (ad esempio gli acidi biliari).

L'Ecuador è un paese che annualmente macella una quantità elevata di bovini, suini e ovini. I volumi dei rifiuti, intesi come scarti di lavorazione, sono molto inferiori rispetto a quelli generati in altri paesi del Sud America, poichè i diversi scarti ottenuti dalla macellazione che non sono idonei al consumo umano per la maggior parte vengono convogliati in canali di scolo o portati al più vicino corso d'acqua senza alcun tipo di trattamento. Uno di questi scarti è la bile, sostanza che si trova all'interno della cistifellea di questi animali.

In questa ricerca viene effettuata una valutazione generale delle condizioni di macellazione, della gestione dei rifiuti con particolare attenzione alla bile e dei volumi approssimativi di carne macellata nei macelli più importanti.

La ricerca riguarda diverse province dell'Ecuador: Guayas, Pichincha, Manabi, Esmeraldas, Tungurahua, Chimborazo, Carchi, Imbabura, Morona Santiago.

**Il macello municipale di Riobamba<sup>30</sup>** (Provincia: Chimborazo, Cantón: Riobamba) si trova sulla Avenida Leopoldo Freire all'uscita sud-est di Canton Chambo, insieme alla ditta Tubasec, adiacente al Grande Mercato dei prodotti agricoli. La zona limitrofa è densamente popolata ed è in fase di sviluppo anche per l'attività commerciale: nuovi negozi di generi alimentari, farmacie, ecc.

Il macello fornisce come servizi ai cittadini l'accettazione di animali provenienti da privati per essere macellati, la custodia di animali da macello, i lavori di macellazione, i lavori di ispezione *post mortem* su allevamenti di bovini, ovini e suini che riforniscono il mercato locale, intercantonale e interprovinciale. Le aree di macellazione di ovini, suini e bovini sono separate. Il numero di animali macellati è di 120-130 bovini, 350 suini e 350 pecore al giorno e questa attività viene svolta per quattro giorni alla settimana per un numero mensile di circa 2.500 bovini.

### ***Gestione della bile***

Nel macello di Riobamba vengono raccolte le cistifellee del bestiame per la rivendita primaria mentre non vengono effettuati processi di pre-elaborazione per la separazione della bile dall'organo di raccolta.

Nel macello vengono raccolte circa 2 vasche e mezzo (di 200 litri ognuna) di bile al mese, ogni serbatoio viene venduto ad una società della città di Santo Domingo per un valore di \$ 50 USD. Non si è a conoscenza di come viene utilizzata la bile in seguito alla vendita.

La bile di maiali e pecore non viene raccolta o venduta dal macello ma viene semplicemente scartata con altri rifiuti.

### ***Altri rifiuti***

L'unico residuo che riceve un ulteriore trattamento per la commercializzazione è il sangue dei bovini, con cui si produce una farina di sangue animale che viene utilizzata come cibo per gli animali. Tutti gli altri rifiuti liquidi vengono scaricati nelle fognature senza eseguire un pretrattamento. Per quanto riguarda i rifiuti solidi vengono trasportati, mediante apposite cisterne, alla discarica della città.

### ***Impatto ambientale***

Il macello municipale di Riobamba è una società che produce vari rifiuti solidi organici (letame, peli, grasso, pezzi di carne, ossa o altre parti commestibili) che causano gravi problemi ambientali alle risorse idriche, al suolo e all'aria. La quantità di questi rifiuti, inadatti al consumo umano, varia dal 20 al 50% (a seconda del tipo di animale): la maggior parte sono rifiuti putrescibili e devono essere maneggiati con cura per evitare odori e diffusione di malattie. Tutti questi rifiuti, ad eccezione delle feci generate nella fase di stoccaggio e di trasporto degli animali da macello, possono essere riutilizzati per ridurre considerevolmente l'emissione di rifiuti solidi.

**Il macello municipale di Ambato<sup>31</sup>** (Provincia: Tungurahua; Cantón: Ambato; Parroquia: Izamba; Sector: Parque Industrial) ha come responsabile il sindaco, l'architetto Fernando Callejas, che ha delegato la signora Adela Ortiz come amministratrice di questa struttura. Per accedere al servizio di macellazione si deve pagare una tassa di 17.35 \$, inoltre è necessaria una scheda di registrazione avente un costo annuale di \$ 85 per macellare grandi volumi (oltre i 50 capi) e di \$ 40 per i volumi meno elevati (meno di 50 capi macellati). Le altre spese effettuate (trasporto dei visceri, trasporto della carne, permessi vari, ecc.) vengono sostenute dalle casse comunali.

Il macello della città di Ambato si trova nel centro dell'Ecuador. Vengono macellati bovini (le razze più comuni sono Jersey, Brahman, Holstein, Charolais, Pardo svizzero e Normandy), suini e ovini (capre e llamingos). I bovini macellati sono circa 150 al giorno, il

15% è per il consumo locale e per le province centrali del paese, il restante 85% viene trasportato alla Provincia Guayas.

I prodotti finali di macellazione sono la carne (con ossa), viscere, pelli e rifiuti (teste, sangue, zoccoli, feci, ecc.).

### ***Gestione della bile***

La bile nel macello comunale di Ambato viene raccolta in serbatoi di 220 litri (ogni mese vengono prodotti circa 3 serbatoi) che successivamente vengono venduti a \$ 85 ciascuno. Si tratta di una stima quantitativa di 600 litri che vengono venduti ad un acquirente colombiano che tratta la bile per la produzione della passata di bile, che viene commercializzato all'estero.

La bile dei suini e degli ovini, una volta raccolta, viene gettata insieme ai rifiuti di origine animale. Pertanto non ci sono dati sulla quantità di bile ottenuti da suini e ovini.

### ***Impatto ambientale***

Nella visita al macello si è osservato che vengono prodotti circa 7 m<sup>3</sup> di ruminati al giorno, e tra i 12 e 15 litri di sangue per ogni animale. Per quanto riguarda la produzione di rifiuti solidi (che vengono portati direttamente in discarica o nei punti di raccolta della città) non sono disponibili dati per quantificarne il volume. I rifiuti liquidi, compreso il sangue, vengono convogliati così come tali nel sistema fognario senza alcun pre-trattamento mirato alla prevenzione dell'inquinamento ambientale, mentre i rifiuti solidi vengono gettati in discarica. I rifiuti scaricati nelle fogne convogliano ad un impianto comune in cui vengono trattati e usati per produrre fertilizzanti per l'agricoltura.

Vi è un elevato grado di contaminazione ambientale per la maggior parte provocata dalla gestione degli scarichi liquidi. Per questa ragione sarebbe necessario un monitoraggio continuo delle attività del macello al fine di ridurre il rischio per la popolazione e per le zone circostanti in generale.

**Il macello municipale di Pedernales<sup>32</sup>** (provincia: Manabi; canton: Pedernales; posizione: al 5.5 km della strada comunale che porta a San Vicente) fornisce alla popolazione i servizi di custodia degli animali da macello fino al momento della macellazione e di macellazione degli animali. Il macello è stato progettato in modo tale da avere aree per la macellazione di bovini, suini e un mercato del bestiame che si rivolge agli enti locali e internazionali.

In questo macello il numero approssimativo dei capi di macellazione settimanale è di 26 bovini e di 50 suini. Questi numeri sono approssimativi e possono variare durante l'anno.

### ***Gestione della bile***

La bile prodotta dal processo di macellazione di bovini e suini non viene sottoposta ad alcun trattamento, non viene venduta o utilizzata, ma viene semplicemente eliminata insieme ai rifiuti. Nel macello non vengono registrate le quantità di bile prodotta. Per questo motivo è stato utilizzato un campione di 10 mucche per avere un'idea della quantità di bile contenuta in questi animali. In media la quantità di bile per mucca è pari a 230 ml. I valori sono compresi tra 150 ml e 600 ml.

Tecnicamente non è possibile stabilire un valore esatto della quantità di bile presente nella cistifellea del bestiame poiché essa è influenzata da diversi fattori quali età, sesso, razza, dieta, habitat, riposo nella stalla, disponibilità di acqua, ecc.

Nel macello di Pedernales hanno una produzione di bile di circa 250 ml per vacca per un totale di 26 litri al mese, che non è un numero elevato considerando i valori di altre città come Manta che producono 290 litri di bile mensile.

### ***Altri rifiuti***

Solamente il ruminante viene commercializzato dopo essere stato raccolto in un serbatoio avente la capacità di 220 litri e venduto al prezzo di \$ 200 per serbatoio. Vengono prodotti circa due serbatoi al giorno.

I rifiuti liquidi come il sangue vengono immagazzinati in un serbatoio, un camion dotato di cisterna preleva quotidianamente questi rifiuti e li porta nel luogo di raccolta dei rifiuti della città. I rifiuti solidi vengono raccolti ogni giorno da un camion che trasporta tutti i rifiuti nella discarica comunale.

Il 25% del peso totale di animali vivi può essere considerato come rifiuto (letame, contenuto dello stomaco, sangue, ossa, peli, zoccoli, corna, frammenti di tessuto adiposo, connettivo e muscolare, ecc.). In tabella 2 vengono riportate le tipologie di rifiuti prodotti con le relative quantità per animale.

**Tabella 2.** Rifiuti di macellazione

	<b>Suini</b>	<b>Vitelli</b>
Letame liquido	2-3.5 kg	7.5-30 kg
Sangue	4-6 l	20-35 l
Ossa	9 kg	66 kg
Contenuto dello stomaco	40 kg	80 kg

***Impatto ambientale***

La discarica comunale si trova a 16 km dalla città, strada a Jama, a 2 km prima del Palmar. In questo luogo vengono depositati tutti i rifiuti senza alcuna regolamentazione sanitaria e per questo è una zona particolarmente soggetta ad inquinamento ambientale con conseguenti malattie.

I rifiuti solidi e liquidi, prodotti dalla macellazione, vengono versati nello scarico o in flussi d'acqua. In aggiunta al danno ambientale, questo tipo di comportamento genera un grande spreco di risorse (sottoprodotti della macellazione) che possono essere potenzialmente riutilizzate. Una parte dei rifiuti prodotti dopo la macellazione di bovini, suini e ovini presenti nel macello di Pedernales, nel nord Manabi vengono scaricate nel fiume. In tali acque gli abitanti di questa regione lavano i vestiti e loro stessi. Per quanto riguarda gli altri rifiuti residui vengono sepolti nella discarica comunale.

**Il macello municipale di Guayaquil<sup>33</sup>** (Provincia: Guayas; Cantón: Guayaquil; Posizione: quartiere Cuba in una zona densamente popolata) è un'azienda nella quale si macellano bovini e suini per i mercati privati presenti nella provincia di Guayas, principalmente nella città di Milagro.

Il macello comunale si rifornisce di acqua potabile dalla rete pubblica amministrata dalla direzione dell'acqua del Comune. L'acqua viene pompata da pozzi e raccolta in una cisterna.

***Gestione della bile***

Il macello comunale di Guayaquil viene utilizzato per la macellazione di bovini e suini. Vi sono persone che pagano per la macellazione e che prendono assolutamente tutti i rifiuti di origine animale che non sono utilizzati ad esempio la bile. Questi commercianti oltre a far macellare i propri capi di bestiame vendono la bile alla ditta NUNSA, società che elabora

la bile e la vende all'estero. È da notare che nel macello non solo si raccoglie la bile bovina, ma anche quella suina.

Il macello comunale di Guayaquil è quello che ottiene il maggior volume di bile nella provincia di Guayas per i numeri elevati di bestiame che vengono macellati in questa sede. Si ottengono approssimativamente 2000 litri di bile da bovini alla settimana e questa viene consegnata a grossisti o a coloro che hanno pagato per il servizio di macellazione. In seguito queste aziende commercializzano la bile a ditte come NUNSA.

### ***Altri rifiuti***

Durante le attività di produzione del macello si generano rifiuti solidi e liquidi.

Nel macello comunale, durante il processo di macellazione di bovini e suini, vengono generati i seguenti rifiuti solidi: rifiuti derivanti dalla sanitizzazione, sangue, pezzi di grasso, avanzi, crani, orecchie, coda, corna, ossa, mascelle, pelli, peli.

### ***Impatto ambientale***

Sangue coagulato, rifiuti derivanti dalla sanitizzazione, letame, pezzi di grasso, peli, zoccoli, orecchie, coda, corna, ossa e mascelle vengono inviati alla discarica. La pelle degli animali viene ritirata dai clienti del macello.

Gli scarti liquidi contengono sangue, grasso e feci. Vengono gettati nelle fognature dopo essere stati filtrati attraverso un colino per trattenere le parti solide più voluminose.

Il responsabile della presentazione di zona Dr. Josefa Cevallos ha indicato che in media vengono prodotti 566.550 kg di rifiuti alla settimana, questi includono sangue e letame animale. Nel macello si macellano circa 51485 bovini. Un manzo genera una media di 40 kg di rumine e 10 kg di letame. I rifiuti sono spediti in contenitori verso la più vicina discarica.

**Il macello municipale di Esmeraldas “San Mateo”<sup>34</sup>** (Provincia: Esmeraldas; Cantón: Esmeraldas; Posizione: parrocchia di San Matteo in una zona densamente popolata) accetta animali da privati, costudisce gli animali da macellare, esegue la macellazione stessa, l'ispezione sanitaria *pre e post mortem* di bovini e suini destinati al mercato locale, intercantonale e interprovinciale. E' progettato con aree separate per la macellazione di suini e bovini. Questo macello lavora approssimativamente 375 bovini e 120 suini alla settimana. Ogni mese vengono macellati circa 1.500 bovini e 480 suini.

### ***Gestione della bile***

In questo macello viene prodotta una quantità di bile pari a circa 220 litri al mese e viene raccolta in un serbatoio. Ogni serbatoio viene venduto a \$ 50 ad una società di Quito che esporta la bile all'estero. Si stima che circa 375 litri di bile ogni mese vengono della macellazione di bovini.

In questo macello la bile suina e quella derivante dalle pecore non viene raccolta.

### ***Altri rifiuti***

E' stato stimato che il macello produce una quantità di rifiuti pari a circa 977.920 kg/mese, ma non esiste un monitoraggio regolare dei rifiuti prodotti. Questi residui sono costituiti in gran parte da peli, pelle, ossa, sterco, ruminanti e frattaglie inadatte al consumo umano.

Per quanto riguarda il volume di rifiuti liquidi il macello non possiede un report perché tutte le acque vengono scaricate direttamente in un canale comune, per cui è molto difficile misurare il volume di rifiuti per ogni step del processo.

Il sangue è uno dei sottoprodotti che non vengono utilizzati e viene versato in condutture fognarie della città di Esmeraldas o convogliato nei fiumi o nei torrenti vicini.

La composizione delle acque reflue dei macelli, come il suo flusso, varia nel tempo, a seconda delle operazioni svolte: lavori di uccisione o di pulizia generale.

### ***Impatto ambientale***

I rifiuti della macellazione vengono smaltiti in maniera irresponsabile e questo influenza negativamente l'ambiente. Il cattivo odore può essere l'unico problema rilevante di inquinamento atmosferico. Esso è il risultato dell'attività batterica sulla materia organica, oltre alle emissioni di gas da processi di incenerimento.

L'inquinamento dell'acqua è uno dei problemi principali riscontrati in questa zona a causa dei volumi di liquidi con una forte domanda biochimica di ossigeno (BOD<sub>5</sub>) dovuta alla quantità di solidi sospesi spesso costituiti da grasso. I lavaggi dei sottoprodotti e delle attrezzature richiedono grandi quantità di acqua e presentano un grande spreco.

Nella macellazione degli animali (bovini, suini), il sangue è ciò che più potrebbe contribuire a contaminare l'acqua. Ad esempio, solo il 70% del sangue di bovini è recuperabile e utilizzabile per una ulteriore elaborazione. Un'altra fonte di acque reflue sta nelle acque di lavaggio, nella fase di sezionamento delle carcasse bovine.

I parametri più significativi di contaminazione di questo tipo di rifiuti sono: richiesta biochimica di ossigeno (BOD<sub>5</sub>), solidi sospesi totali (TSS), oli e grassi, pH, coliformi fecali, azoto organico, di tanto in tanto i livelli di ammoniaca.

La produzione di rifiuti organici nel macello può influenzare la flora e la fauna a causa delle variazioni di pH che si verificano nell'acqua. Lo smaltimento dei rifiuti organici provoca un impatto positivo sulla flora dal momento che i terreni si arricchiscono e diventano più fertili, questo si traduce in un aumento di vegetazione.

I grassi sono elementi di contaminazione dell'acqua a causa della loro lenta degradazione. La loro presenza è di medio o lungo termine nell'acqua. Il film lipidico che si forma impedisce l'ossigenazione e questo comporta una limitata capacità di auto-purificazione. Per questo motivo è necessario l'utilizzo di processi chimici e fisici per la flocculazione e la sedimentazione in impianti per il trattamento delle acque.

Questi composti bloccano il passaggio della luce attraverso l'acqua, ritardando così la crescita di alghe. I corsi d'acqua assumono un aspetto sgradevole inoltre molti di questi grassi risultano essere tossici per alcuni pesci e per altri organismi acquatici.

Uno degli effetti della presenza di sostanze organiche in luoghi dove naturalmente non sono presenti è la proliferazione di ratti, mosche, avvoltoi, che possono diventare un problema in quanto trasmettono malattie.

I terreni sono generalmente più fertili intorno ai macelli perché le acque reflue vi trasportano sostanze nutrienti. Tuttavia in San Mateo, Esmeraldas, questo fatto non può essere sfruttato perché l'acqua di scarico presenta un'alta percentuale di organismi patogeni.

Tutti i rifiuti liquidi vengono scartati nei corsi d'acqua limitrofi portando un forte aumento dei nutrienti che variano l'ecosistema facendo diminuire la densità delle specie. Essi provocano inoltre cambiamenti nelle specie dominanti, quali aumento della biomassa animale e vegetale, maggiore grado di torbidità e di sedimentazione, a seconda della lunghezza del sistema idrico possono produrre anossia.

Nel macello comunale di San Mateo (Esmeraldas) i lavoratori che svolgono compiti di lavaggio, pesatura, macellazione, scuoiatura, taglio, preparazioni intestinali, pulizia e preparazione delle pelli, possono acquisire malattie infettive quali brucellosi, antrace, fistola e tubercolosi. Vengono inoltre esposti a parassiti come la tenia e la malattia idatidea. La decomposizione della materia organica può generare anche acido solfidrico o di ammoniacca che tendono a irritare gli occhi e la pelle. Variazioni di temperatura e dei gas emessi durante il processo, attivano l'infiammazione delle vie respiratorie, gastrointestinali e renali.

Il volume di liquidi prodotti riflette il consumo e quindi lo spreco di acqua: si stima che tra l'80% e il 95% dell'acqua utilizzata diventa rifiuto liquido che viene scaricato con le acque reflue.<sup>35</sup>

**Il macello municipale di Antonio Ante** (Provincia: Imbabura; Cantón: Antonio Ante; Posizione: Panamericana Norte sector Catabamba, Parrochia Natabuela) è stato costruito circa 25 anni fa, si trova tra la Panamericana e il fiume Tejar in un'area residenziale. All'interno dell'area macello si trova l'Hostal Nightingale e la cittadella Angel Escobar, per questa ragione vi è un conflitto per quanto riguarda l'utilizzo del suolo. Sul lato destro del macello si trova un burrone, che è la ragione principale della presenza di roditori all'esterno e all'interno del macello.

Il macello di Antonio Ante offre i servizi di stoccaggio di bestiame, macellazione, refrigerazione e trasporto delle carcasse. Dispone inoltre di altre strutture per il lavaggio dei visceri. La tassa, pagata alla tesoreria comunale, è di \$ 10 per animale da macellare.

Le infrastrutture che possiede questo macello sono la zona di stordimento per bovini e suini, l'area di scuoiatura e l'area di eviscerazione. Inoltre è presente una camera fredda, un'area per il lavaggio delle viscere commestibili (nella navata di macellazione) e un'area dedicata alle stalle che si trova all'esterno del macello.

Il macello occupa una superficie di 17.110 m<sup>2</sup>. L'edificio si estende per circa 580 m<sup>2</sup> con due stalle di circa 177 m<sup>2</sup>.

Nel macello lavorano circa 10 persone tra cui: 3 guardie, 5 macellai, un autista e un veterinario-amministratore. Il personale esterno viene assunto direttamente dai proprietari dei bovini e consiste in 3 operai addetti al lavaggio dei visceri, 2 decapitatori e 2 addetti allo scuoiamento e al sezionamento dell'animale.

### ***Gestione della bile***

Nessuna informazione è disponibile per il trattamento effettuato sulla bile all'interno del macello. Nella zona dove si svuotano le interiora degli animali vi è una rampa che conduce i visceri, sia bianchi che rossi, alla zona di lavaggio dove alcune persone, che non appartengono al macello, gestiscono questi prodotti. I visceri rossi vengono separati, lavati e trasportati in sacchi di plastica mentre quelli bianchi vengono tagliati per rilasciare il contenuto del ruminante e successivamente vengono lavati internamente ed esternamente.

### ***Impatto ambientale***

Il macello genera una serie di rifiuti organici solidi che causano gravi problemi ambientali alle risorse idriche, al suolo e all'aria in quanto non sono gestiti correttamente. Si tratta di letame, peli, grasso, pezzi di carne, ossa o altre parti commestibili. Tutti questi scarti sono gettati nel sistema fognario. Materiale inadatto al consumo umano risulta essere il 20-50% del peso dell'animale (questo dipende dal tipo di animale). La maggior parte sono rifiuti putrescibili e devono essere maneggiati per evitare odori e diffusione di malattie. Tutti questi rifiuti, ad eccezione delle feci, possono essere riutilizzati per ridurre considerevolmente l'emissione di rifiuti solidi.

**Il macello municipale di Latacunga<sup>36</sup>** (Provincia: Cotopaxi; Cantón: Latacunga; Posizione: quartiere San Martín parrochia Juan Montalvo) fornisce tutto il prodotto macellato, comprese le frattaglie, pelli e altri prodotti ai loro proprietari. Parte di merchandising è fatta al di fuori della ditta.

Questo macello non è dotato di camere frigorifere per la manutenzione della carne dopo il processo di macellazione. Per questo motivo offre solamente il servizio di uccisione del bestiame. La macellazione di suini e bovini origina mensilmente circa 20 tonnellate di feci e di sangue nei fiumi vicini.

#### ***Impatto ambientale***

In questo macello non vi sono controlli riguardanti le attività svolte al suo interno, inoltre non viene monitorata la situazione dei corsi d'acqua dove vengono gettati i rifiuti solidi e liquidi (fiumi Yanayacu e Cutuchi).

Non esiste un programma per ridurre il carico di rifiuti che vengono prodotti in quantità elevate.

Per quanto riguarda la progettazione degli scarichi liquidi, non risultano essere conformi alla legislazione vigente per gli scarichi nei corpi idrici.

**Il macello municipale di Cayambe<sup>37</sup>** (Provincia: Pichincha; Cantón: Cayambe; Posizione: Puerto Baquerizo via S / N e Rocafuerte distante sei strade dall'ospedale Raul Maldonado Mejía) possiede aree di stordimento per i bovini, suini e ovini, zona di eviscerazione e zona di lavaggio delle viscere. Presenta inoltre un'area di stazionamento per bovini e ovini sulla parte laterale e un porcile retrostante al macello.

#### ***Gestione della bile***

Al momento in questo macello non è previsto una lavorazione della bile degli animali e non esiste una gestione per il trattamento dei visceri.

### ***Altri rifiuti***

Nel macello di Cayambe mediamente si uccidono 8 capi di bestiame al giorno (la maggior parte dei quali di origine bovina) generando acque reflue in un volume medio di 4.838,4 litri giornalieri. Per quanto riguarda i parametri fisico-chimici, l'amministrazione del macello dichiara che i rifiuti solidi e i solidi sospesi sono tali da rientrare nei limiti consentiti dalla legge.

Poiché comunque la gestione dei rifiuti non viene controllata nel macello di Cayambe vengono generate fonti di inquinamento per le persone che si trovano in quella zona. Si sta cercando di realizzare miglioramenti nella gestione dei rifiuti attraverso la divulgazione delle corrette regole di smaltimento.

### ***Impatto ambientale***

Il macello di Cayambe produce molto inquinamento dovuto sia ai rifiuti stessi, sia allo smaltimento improprio dei sottoprodotti come sangue, rumine, sterco e frattaglie. Inoltre presenta tecniche di gestione inadeguate per le carni dopo il processo macellazione.

**Il macello comunale di Quito<sup>38</sup>** (Provincia: Pichincha; Cantón: Quito; Posizione: Barrio la Ecuatoriana al Sur de la Ciudad de Quito) gestito dalla Società del Macello Metropolitano di Quito lavora seguendo norme tecniche e sanitarie, secondo le disposizioni di legge e regolamenti per fornire prodotti trattati igienicamente, atti all'alimentazione umana, salvaguardando l'ambiente. Al fine di regolare e controllare il funzionamento dei macelli, sono state create istituzioni di vendita chiamate "tercenas di carne" per garantire ai cittadini del Distretto Metropolitano di Quito prodotti di qualità.

In questo macello sono presenti recinti per l'accoglienza e il soggiorno di bovini, suini e ovini, oltre ad aree per il lavaggio e lo stoccaggio di frattaglie.

Il macello metropolitano di Quito presta il servizio di trasporto della carne e delle viscere seguendo la normativa vigente:

- Leggi e regolamenti di macellazione;
- Regolamentazione delle BPM (Buenas Practicas De Manufactura);
- Decisión 197 (Legge 197)- Normativa subregionale andina- JUNAC;
- Codice della salute;

- Normativa interna-EMRQ.

Il macello realizza il controllo fitosanitario degli animali prima che siano macellati secondo le regole stabilite dal ministero dell'agricoltura dell'Ecuador. Realizza inoltre controlli negli allevamenti. Si seguono procedure, istruzioni e manuali che permettono di soddisfare i requisiti sanitari in ogni area e in ciascun settore.

Quotidianamente si effettua il controllo sanitario dell'impianto e il controllo veterinario degli animali.

Il macello metropolitano di Quito<sup>39</sup> effettua controlli in altri macelli che operano nel Cantone di Quito, sia per quanto riguarda strutture rurali sia per strutture urbane. Tali macelli sono:

- ***Carnol:*** si trova nell'angolo nord-occidentale Calacalí, dove sarà allestito il nuovo macello, da gestire possibilmente a livello locale.
- ***Carne Agroindustrias Nord:*** situato nella zona di Llano Grande, questo è un macello privato ma viene ugualmente supervisionato dal macello Metropolitano di Quito.
- ***Macello del Vitello:*** si trova nella zona di Calderon, si tratta di un macello privato controllato dal macello metropolitano.
- ***Macello del Quinche:*** sul lato opposto della valle di Tumbaco.
- ***Macello di Pintag:*** sul lato opposto del macello di Quito, nella parte sud della città verso il Valle de los Chillos
- ***Macello di Conocoto:*** nella stesa posizione del precedente.

#### ***Lavorazione dei rifiuti***

Dal 2007 il macello metropolitano dispone di un biodigestore e quindi è in grado di produrre prodotti per la alimentazione equilibrata degli animali e fertilizzanti organici per l'arricchimento del suolo. La capacità di elaborazione è di 6.000 litri di sangue al giorno, la stessa di quella ottenuta nel processo di macellazione delle tre linee di bestiame: bovini, suini e ovini.

La farina viene commercializzata a floricoltori che la utilizzano come concime per la terra, inoltre viene utilizzata per generare alimenti per animali domestici. Quotidianamente ne vengono prodotti circa 1200 Kg.

***Gestione della bile***

Nel macello di Quito si ottengono 208 litri alla settimana di bile. Viene venduta a \$ 130 ogni 55 galloni. Si producono circa 397 galloni al mese.

Si raccolgono 400-500 g all'anno di calcoli biliari che si vendono al prezzo di 12 USD il grammo a ditte coreane e colombiane.

La vendita della bile e dei calcoli biliari genera un mercato di circa 10.000 dollari all'anno.<sup>40</sup>

***Impatto ambientale***

Uno dei maggiori problemi del macello Metropolitano di Quito è il trattamento delle acque reflue. Data la grande quantità di rifiuti versati in queste acque, viene prodotto un odore pungente e nauseante oltre all'aumento di mosche, il tutto in una zona dove si effettua la vendita di cibo locale.

A livello nazionale vi sono molti difetti per quanto riguarda l'utilizzo, il trasporto e la gestione del bestiame. Altre difficoltà riguardano le strutture e le attrezzature di macellazione oltre alle condizioni igienico-sanitarie non adeguate. Il processo di macellazione è molto eterogeneo in Ecuador e il macello metropolitano di Quito risulta essere il più grande istituto tecnologico. Ovviamente tutti i giorni ci si scontra con le problematiche dovute ai tentativi di miglioramento dei servizi nel cantone di Quito.

## **PROGETTO E STRATEGIA**

La lavorazione della bile suina e di quella bovina, mirata all'ottenimento dell'acido ursodesossicolico, comporta la produzione di una serie di prodotti di scarto. Questi, non potendo essere immessi come tali nel ciclo produttivo dell'acido ursodesossicolico, costituiscono una grande perdita di materiale.

Ad oggi, per la risoluzione di questi problema, non esistono reazioni chimiche, competitive dal punto di vista dei costi, in grado di poter modificare tali composti. In questo ambito la biocatalisi può essere una via alternativa alla modifica nel senso voluto dei prodotti cosiddetti di scarto della lavorazione della bile.

Le reazioni microbiologiche ed enzimatiche più studiate a carico degli acidi biliari e dei loro coniugati, sono quelle che prevedono la conversione dell'acido desossicolico (DCA, bile bovina) e dell'acido iodesossicolico (YDCA, bile suina) rispettivamente in acido chenodesossicolico (CDCA) e acido ursodesossicolico (UDCA).

Le reazioni che permettono di raggiungere questo obiettivo, come descritto precedentemente, sono le idrolisi selettive, l'epimerizzazione delle funzioni idrossiliche mediante ossidazione e successiva riduzione, l'idrossilazione di posizioni opportune dell'anello e l'eventuale deidrossilazione.

I processi di epimerizzazione, in particolare quelle delle funzioni ossidriliche, sono state molto studiate in quanto consentono la produzione di 3 $\beta$ - ed in particolare 7 $\beta$ -idrossi acidi (ad esempio acido ursodesossicolico). Possono avvenire sia per via ossido riduttiva, avendo come intermedi i relativi cheto derivati,<sup>16</sup> che mediante deidrossilazione e conseguente  $\beta$ -idrossilazione.<sup>17</sup> Gli enzimi che partecipano in queste reazioni sono delle 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -idrossisteroidi deidrogenasi NAD(P)<sup>+</sup>-dipendenti o delle 7 $\alpha$  idrossisteroidi deidrossilasi assieme a delle 7 $\beta$  idrossisteroidi idrossilasi. Altri importanti enzimi ossido riduttivi sono le deidrogenasi NAD(P)<sup>+</sup>-dipendenti in grado ossidare e ridurre regioselettivamente la posizione C-12 dell'acido colico.<sup>41,42</sup>

Il lavoro oggetto di questa tesi s'inserisce in un progetto di ricerca in corso da alcuni anni nel laboratorio di Biocatalisi e Biotrasformazioni del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie. Esso riguarda l'individuazione di batteri in grado di biotrasformare molecole steroidee. In particolare l'attenzione si è focalizzata sulla ricerca di nuove idrossisteroide deidrogenasi (HSDH), enzimi in grado di catalizzare reazioni di riduzione e ossidazione a carico di gruppi ossidrilici presenti in specifiche posizioni dell'anello steroidico degli acidi biliari, e di 7 $\beta$ -idrossilasi in grado di ossidrilare l'acido desossicolico

e iodesossicolico per ottenere rispettivamente l'acido colico e iocolico che possono rientrare nel ciclo produttivo dell'acido ursodesossicolico, principio attivo per il trattamento dei calcoli biliari.

## **MATERIALI E METODI**

## Strumenti e reagenti

Il terreno di coltura Plate Count Broth (PCB) è stato acquistato dalle ditte Dipco (Ecuador) e Oxoid (Italia).

Gli acidi biliari sono stati forniti dalla società I.C.E. s.r.l.

I reattivi ed i solventi utilizzati sono prodotti commerciali e sono stati usati senza ulteriori purificazioni.

Le biotrasformazioni sono state seguite per cromatografia su strato sottile (TLC) impiegando lastre di gel di silice Kieselgel 60F<sub>254</sub> Merck. Le purificazioni sono state effettuate per cromatografia su colonna di silice Kieselgel 60 Merck.

Per l'identificazione di alcuni prodotti si è anche fatto ricorso all'analisi <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR in soluzione di CD<sub>3</sub>OD, ove non diversamente specificato, impiegando uno strumento Varian-Gemini 300 (300 MHz): i chemical shift sono dati in ppm.

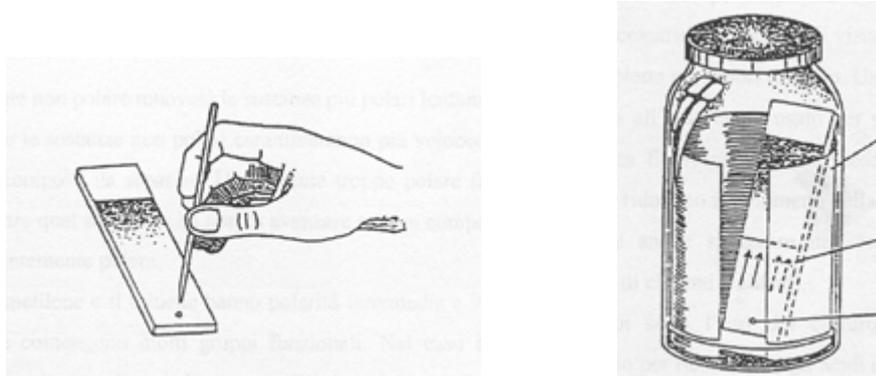
La sterilizzazione dei brodi di coltura è avvenuta in autoclave Modello 760.

Gli inoculi sono stati eseguiti sotto cappa a flusso laminare Asalair Vertical 700.

Le cellule sono state incubate in incubatori Climatic Hood 710.

## Analisi dei prodotti per cromatografia su strato sottile (TLC)

Vengono prelevati 2 ml di brodo di coltura, si acidifica con HCl 5% per portare il pH ad un valore pari a 2 e si estrae con 2 ml di etil acetato. La fase organica separata viene seminata per mezzo di un capillare su una piastra da TLC e posta in becher contenente un'opportuna fase eluente vale a dire una miscela 50:1 di etil acetato e acido acetico per le biotrasformazioni di acido colico e una miscela 70:30:2 di etil acetato, cicloesano e acido acetico per gli acidi desossicolico e iodesossicolico (Figura 1).



**Figura 1**

Al termine dello sviluppo, dopo aver fatto evaporare il solvente, la lastra di gel di silice viene nebulizzata con una soluzione rivelatrice costituita da acido fosfomolibdico ( $H_3Mo_{12}O_{40}P$ ), acido solforico ed acido acetico in proporzioni 2.5:2.5:5 e riscaldata ( $120^{\circ}C$ ) allo scopo di rendere visibili i prodotti di reazione. Gli standard utilizzati come termine di paragone sono gli acidi biliari di partenza e i relativi prodotti di ossidazione di alcune posizioni(es. C3, C6, C7).

## **CAMPIONAMENTO MICRORGANISMI**

(macello di Latacunga)

Il campionamento di funghi e batteri è stato fatto presso il macello della città di Latacunga (provincia di Cotapaxi) il 12 ottobre 2010.

### ***Processo di macellazione***

L'intero processo di macellazione dei bovini che consiste nei seguenti step:

- Una volta arrivato l'animale viene portato in una camera dove, dopo essere stato bagnato, viene sottoposto ad una scarica elettrica necessaria per lo stordimento.
- Il manzo viene trasferito in un'altra stanza nella quale si effettua l'uccisione dell'animale recidendo l'arteria principale. Questa operazione comporta la morte dell'animale e permette di eliminare il sangue dallo stesso. Successivamente in questa zona vengono amputate teste e zampe.
- Nella zona successiva viene rimossa la pelle.
- Vengono poi tolte le viscere.
- Il manzo viene trasferito nell'area dove si effettua il taglio in pezzi della carne.

### ***Descrizione dell'area del macello***

Le pareti sono rivestite di piastrelle bianche, i pavimenti sono in marmo. I tavoli presenti sono in acciaio. Le viscere e le frattaglie vengono raccolte in recipienti di plastica. La pulizia viene effettuata dopo la macellazione utilizzando acqua e detersivo e, una volta alla settimana, la candeggina.

### ***Aree di campionamento***

Si definiscono le seguenti aree di campionamento:

A1 - Area in cui si raccolgono le teste, le zampe e la pelle dei bovini macellati.

A2 - Area di lavorazione delle viscere: il campionamento dei recipienti di plastica contenuti l'interno dello stomaco, tavola di ricezione delle viscere, pavimento, e pareti.

A3 - Area di taglio del bestiame: in questo settore sono i campioni sono stati prelevati dai flussi d'acqua: 3A (canale proveniente dalla zona di lavorazione di visceri) e 3B (canale maggiore che raccoglie l'acqua proveniente dallo spazio di macellazione).

Area Esterna: campioni provenienti dalla fossa esterna che raccoglie l'acqua in uscita dal macello in un pozzo, lo scarico di questo pozzo viene portato al fiume.

### ***Procedura isolamento batteri***

- Si preparano provette con 5 ml di soluzione fisiologica provviste di tamponi di cotone, che sono state debitamente sterilizzate ed etichettate e mantenute in frigo.
- Si procede al campionamento dando la priorità alle aree del macello in cui vengono lavorate le viscere (contenitori e acque di scarico dentro e fuori l'area del macello).
- Per il campionamento si utilizza un tampone di cotone sterile che, una volta strisciato, viene immerso nella provetta con soluzione fisiologica e chiuso ermeticamente.
- I campioni prelevati nel macello sono trasportati a Quito (89 Km a nord di Latacunga) in un cooler, mantenendo la temperatura a 4°C.
- Nel laboratorio del Civabi dell'Universidad Politecnica Salesiana i campioni sono mantenuti in frigo a 0°C.
- I vari campioni (diluizione  $10^{-4}$ ) vengono seminati in due petri contenenti Plate Count Agar (Difco) a cui sono stati aggiunti rispettivamente 5% del sale sodico dell'acido desossicolico e 5% del sale sodico dell'acido iodesossicolico.
- Dopo 24 h di crescita i microorganismi isolati vengono seminati in nuove piastre petri contenendo il medesimo terreno, fino al isolamento dei ceppi.
- Ai ceppi isolati viene assegnato un codice di identificazione in Ecuador (Tabella 1).

**Tabella 1.** Batteri isolati nel macello di Latacunga,

<b>Città</b>	<b>Luogo prelievo</b>	<b>Sigla Ecuador</b>	<b>Sigla</b>
Latacunga	canale d'acqua interno dell'impianto	canal mayor 1	MM B1
Latacunga	recipiente di raccolta delle viscere	2D1L	MM B2
Latacunga	area di immagazzinamento della pelle	1B1L	MM B3
Latacunga	canale d'acqua interno all'impianto	canal mayor 2	MM B4
Latacunga	recipiente di raccolta delle cistifellee	2E2L	MM B5
Latacunga	tavolo di accettazione delle viscere	2AL	MM B6
Latacunga	area di lavorazione dell'animale	2B1L	MM B7
Latacunga	fossa d'acqua esterna all'impianto	fosa exterior 11	MM B8
Latacunga	area di lavorazione dell'animale	3B1L	MM B9
Latacunga	area di raccolta delle viscere	2C1L	MM B10
Latacunga	tavolo di accettazione delle viscere	2A1L	MM B11
Latacunga	recipiente che contiene il ruminale	2T6L	MM B12
Latacunga	fossa d'acqua esterna all'impianto	fosa exterior 2 1	MM B13
Latacunga	pavimento area di immagazzinamento della pelle	2F'1L	MM B28
Latacunga	recipiente di raccolta delle cistifellee	2E1L	MM B41
Latacunga	pavimento area di devisceramento	2CL	MM B60

### ***Procedura isolamento funghi***

- I vari campioni (diluizione  $10^{-4}$ ) vengono seminati in due petri contenenti Sabouraud Dextrose Agar (Difco) con Cloramfenicolo al 1% e vengono aggiunti rispettivamente 5% del sale sodico dell'acido desossicolico e 5% del sale sodico dell'acido iodesossicolico.
- Dopo 7 g di crescita le piastre petri sono analizzate e i funghi isolati si riseminano in nuove piastre fino all'isolamento dei ceppi.
- Ai ceppi isolati è assegnato un codice di identificazione in Ecuador (Tabella 2).

**Tabella 2.** Funghi isolati nel macello di Latacunga

<b>Città</b>	<b>Luogo prelievo</b>	<b>Sigla Ecuador</b>	<b>Sigla</b>
Latacunga	tavolo di accettazione delle viscere	2A	MM F4
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	2F1	MM F12
Latacunga	canale d'acqua interno area di lavorazione	2B''	MM F14
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	2F4	MM F15
Latacunga	recipiente di raccolta rumine	3A(3T)	MM F16
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	2F5	MM F18
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	2F2	MM F19
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	2F41	MM F21
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	2F51	MM F22
Latacunga	area di raccolta delle pelli	1B	MM F23
Latacunga	recipiente di raccolta rumine	3T	MM F24
Latacunga	recipiente di raccolta delle cistifellee esterno	2DL	MM F26
Latacunga	recipiente di raccolta rumine	2T4(2T)	MM F27
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	32F1	MM F29
Latacunga	pavimento area di raccolta delle viscere	2F6	MM F30
Latacunga	recipiente di raccolta delle cistifellee	2E	MM F31
Latacunga	recipiente di raccolta delle cistifellee	2E(2)	MM F33
Latacunga	recipiente di raccolta rumine	2T2(2T)	MM F34

## **CAMPIONAMENTO MICRORGANISMI**

(macello di Cayambe)

Il campionamento di funghi e batteri è stato fatto presso il macello della città di Cayambe (provincia di Pichincha) in data 8 dicembre 2010.

### ***Processo di macellazione***

Il macello di questa città è una nuova struttura e, a differenza del macello di Latacunga, il processo completamente manuale e richiede molto più tempo.

Gli animali vengono tenuti in un campo vicino al macello, vengono immessi in un percorso recintato con strutture metalliche. Al momento dell'uccisione, molti animali, prima di morire rimettono il loro pasto perché essi non sono sottoposti a digiuno prima dell'abbattimento. In questo modo però si sporcano inevitabilmente le pareti.

Nella camera di uccisione non c'è un flusso costante di acqua, ma di volta in volta l'operatore apre un rubinetto che è collegato ad un tubo flessibile.

Una volta arrivato, l'animale viene ucciso con una scarica elettrica a livello celebrale. Successivamente viene appeso ad una catena di acciaio che permette il trasporto su una guida di metallo per facilitare i processi di taglio della testa, taglio delle zampe, scuoiatura, eviscerazione e sezionamento dei pezzi di carne.

Il sangue che esce dal taglio della testa viene raccolto in recipienti; altre parti, come zampe e teste, vengono trasportati in una carriola di metallo come quelle utilizzate in edilizia.

### ***Descrizione dell'area del macello***

Il macello è provvisto di aree di stordimento per bovini, suini e ovini, area di eviscerazione, area di lavaggio per viscere entro il macello. Vi sono anche aree di stalla per suini dalla parte laterale del macello. Il macello di Cayambe genera inquinamento ambientale, sia per i rifiuti solidi o liquidi, a causa di un inadeguato processo di eliminazione dei sottoprodotti come sangue, rumine, letame e viscere ma anche per le inadeguate tecniche di lavorazione della carne sia durante la macellazione sia dopo questo processo.

### ***Aree di campionamento***

Sono stati prelevati campioni della sezione di abbattimento, dalle aree dove viene rimossa la pelle e le viscere e da uno dei contenitori che raccolgono le colecisti.

Area A: A1, pavimento; A2, contenitore di plastica; A3, pareti.

Area B: B1, pareti area dove viene tagliata la gola degli animali; B2, scala di arrivo dei suini al macello; B3, carriola di trasporto; B4, contenitore per la pelle; B5, pavimento aree di scuoiamento; B6, pavimento e rivestimento area di eviscerazione; B7, camera ricezione dei visceri.

Area C: C1, tavolo di lavoro delle viscere; C2, tavolo di lavoro delle viscere; C3, area di taglio; C4, pietra di lavaggio A; C5, pietra di lavaggio B; C6, pietra di lavaggio C; C7, tavolo di ingresso; C8, tavolo di rumine; C9, pietra di ripulitura; C10, pavimento dove vengono appoggiate le teste; C11, pavimento delle mammelle; C12, carretto degli stomaci; C13, recipiente di raccolta viscere; C14, pareti di fianco alle viscere; C15, tavolo d'appoggio per le viscere; C16, attrezzatura.

Area D: D1, raccolta scarti delle cistifellee

#### ***Procedura isolamento batteri***

La procedura di campionamento fatta in questo macello segue la stessa metodologia descritta per l'isolamento dei ceppi di batteri e funghi campionati nel macello della città di Latacunga. Nella Tabella 3 vengono riportati i batteri e nella tabella 4 i funghi isolati nel macello della città di Cayambe.

**Tabella 3.** Batteri isolati nel macello di Cayambe,

<b>Città</b>	<b>Luogo prelievo</b>	<b>Sigla Ecuador</b>	<b>Sigla</b>
Cayambe	contenuto dello stomaco degli animali non a digiuno	12C8'	MM B14
Cayambe	recipiente di raccolta delle viscere	12D1	MM B15
Cayambe	recipiente di raccolta delle viscere	12D1.1	MM B16
Cayambe	lavorazione delle viscere	22C2	MM B23
Cayambe	pavimento di conservazione delle teste	12C10	MM B24
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	41B1	MM B25
Cayambe	pavimento e pareti di eviscerazione	11B6	MM B26
Cayambe	lavorazione delle viscere	12C2	MM B27
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	11B1	MM B29
Cayambe	pavimento delle mammelle	11C11	MM B30
Cayambe	pavimento e pareti di area eviscerazione	3.1B6	MM B31
Cayambe	pareti a fianco delle viscere	21C14	MM B32
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	12B1	MM B 33
Cayambe	area ricevimento viscere	32B7	MM B34
Cayambe	pareti area di lavorazione dell'animale	31A3	MM B35
Cayambe	recipiente di raccolta delle viscere situato all'interno del macello	1.1C13	MM B36
Cayambe	pavimento e pareti di area eviscerazione	221B6	MM B 37
Cayambe	tavolo lavorazione viscere	22C8	MM B39
Cayambe	contenuto dello stomaco degli animali non a digiuno	11C8'	MM B40
Cayambe	pietra lavatoio A	11C4	MM B42
Cayambe	pareti area di lavorazione dell'animale	32A3	MM B43
Cayambe	lavorazione viscere	11C16	MM B44
Cayambe	tavolo lavorazione viscere	21C1	MM B45
Cayambe	pavimento area di lavorazione dell'animale	11A1	MM B46
Cayambe	area ricevimento viscere	22B7	MM B47
Cayambe	area ricevimento viscere	4.1B7	MM B48

Cayambe	area ricevimento viscere	12B7	MM B51
Cayambe	recipiente di raccolta delle viscere	12D1.2	MM B53
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	22B1	MM B54
Cayambe	pareti area di lavorazione dell'animale	12A3	MM B55
Cayambe	pareti a fianco delle viscere	22C14	MM B56
Cayambe	pareti area di lavorazione dell'animale	22A3	MM B57
Cayambe	area ricevimento viscere	2E2	MM B59
Cayambe	pavimento area di spellatura	22B5	MM B61
Cayambe	pareti a fianco delle viscere	11C14	MM B62
Cayambe	recipiente di raccolta delle viscere	11A2	MM B63
Cayambe	area ricevimento viscere	1.1B7	MM B64
Cayambe	pareti area di lavorazione dell'animale	61A3	MM B65
Cayambe	attrezzatura lavorazione dell'animale	2.1C16	MM B66
Cayambe	contenuto dello stomaco degli animali non a digiuno	32C8	MM B67
Cayambe	area ricevimento viscere	61B7	MM B68
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	31B1	MM B69
Cayambe	pietra lavatoio C	21B1	MM B70
Cayambe	pavimento	11C6	MM B71
Cayambe	pareti macello	42B7	MM B72
Cayambe	tavolo del ruminante	21C4	MM B73
Cayambe	vasca	61A3	MM B74

**Tabella 4.** Funghi isolati nel macello di Cayambe,

<b>Città</b>	<b>Luogo prelievo</b>	<b>Sigla Ecuador</b>	<b>Sigla</b>
Cayambe	pareti a fianco delle viscere	21C14	MM F1
Cayambe	area ricevimento viscere	21B7	MM F2
Cayambe	scivolo di entrata maiali	1B2	MM F3
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	1B1	MM F5
Cayambe	spazio esterno al macello	2F3	MM F6
Cayambe	pareti a fianco delle viscere	11C14	MM F7
Cayambe	pareti a fianco delle viscere	12C14	MM F8
Cayambe	area ricevimento viscere	11B7	MM F9
Cayambe	spazio esterno al macello	2F7	MM F10
Cayambe	tavolo lavorazione viscere	2C	MM F11
Cayambe	scivolo di entrata maiali	1B,2	MM F13
Cayambe	area sezionatura carni	1B.3	MM F17
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	2B1	MM F20
Cayambe	recipiente di raccolta delle cistifellee	2D	MM F25
Cayambe	pareti dell'area di accoltellamento	1B.1	MM F28

## Screening di batteri su scala analitica. Procedura generale

Vengono preparate colture su terreno liquido PCB (10 ml in beute da 50 ml) usando come inoculo un prelievo fatto con un'ansa sterile dagli strisci. Dopo 48 h di crescita a 30°C in agitazione (100-110 rpm) si inoculano i vari substrati (1g/L, 100 µl di soluzione preparata sciogliendo 100 mg/ml). Dopo la somministrazione dei prodotti, le colture sono state tenute altre 48 h a 30°C in agitazione. Ogni 24 h sono stati prelevati campioni (1 ml) che vengono acidificati con HCl ed estratti con etile-acetato. La fase organica è analizzata per cromatografia su strato sottile (TLC) utilizzando come solvente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2. La lastra asciugata dall'eluente è stata nebulizzata con una soluzione rivelatrice costituita da acido fosfomolibdico ( $H_3Mo_{12}O_{40}P$ ), acido solforico ed acetico in proporzioni 2.5:2.5:5 e riscaldata (circa 120°C) allo scopo di rendere visibili i prodotti di reazione. I risultati preliminari della capacità biotrasformativa di questi substrati vengono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1.** Screening biotrasformativo di batteri

battere	Acido iodesossicolico	Acido desossicolico	Acido colico
MM B2	X	X	X
MM B3	--	--	--
MM B4	X	X	X
MM B5	X	X	X
MM B6	--	X	X
MM B7	X	X	--
MM B8	--	X	X
MM B9	X	X	X
MM B11	--	--	--
MM B12	--	--	--
MM B13	X	X	--
MM B14	X	X	X
MM B15	X	X	X
MM B16	--	X	X
MM B17	X	X	X
MM B18	--	X	X
MM B19	X	X	X
MM B20	X	X	X
MM B21	X	X	X
MM B22	--	X	--
MM B23	--	--	--

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

## Screening di funghi su scala analitica. Procedura generale

Vengono preparate colture su terreno liquido Sabouraud (20 ml in beute da 50 ml) usando come inoculo un prelievo fatto con un'ansa sterile dagli strisci. Dopo 4 giorni di crescita a 30°C in agitazione (100-110 rpm) si inoculano i vari substrati (1g/L, 200 µl di soluzione preparata sciogliendo 100 mg/ml). Dopo la somministrazione dei prodotti, le colture sono state tenute altre 48 h a 30°C in agitazione. Ogni 24 h sono stati prelevati campioni (1 ml) che vengono acidificati con HCl ed estratti con etile-acetato. La fase organica è analizzata per cromatografia su strato sottile (TLC) utilizzando come solvente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2. La lastra asciugata dall'eluente è stata nebulizzata con una soluzione rivelatrice costituita da acido fosfomolibdico ( $H_3Mo_{12}O_{40}P$ ), acido solforico ed acetico in proporzioni 2.5:2.5:5 e riscaldata (circa 120°C) allo scopo di rendere visibili i prodotti di reazione. I risultati preliminari della capacità biotrasformativa di questi substrati vengono riportati in Tabella 2.

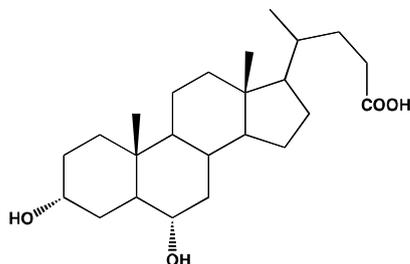
**Tabella 2.** Screening biotrasformativo di funghi

battere	Acido iodesossicolico	Acido desossicolico	Acido colico
MM F1	X	X	
MM F2	scompare	--	--
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	scompare	--	--
MM F19	X	--	--
MM F20	--	X	--
MM F21	--	--	--

MM F22	--	--	--
MM F23	--	scompare	--
MM F24	--	--	--
MM F25	--	--	--
MM F26	--	--	--
MM F27	--	--	--

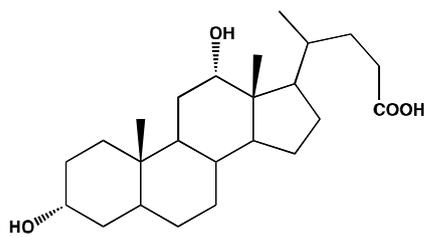
### **Biotrasformazioni di batteri su scala preparativa. Procedura generale**

Vengono preparate colture dei batteri che da analisi TLC hanno dato i risultati più interessanti su terreno liquido PCB (100 ml in beute da 250 ml) usando come inoculo un prelievo fatto con un'ansa sterile dagli strisci. Dopo 48 h di crescita a 30°C in agitazione (100-110 rpm) si inoculano i vari substrati come sali sodici (1g/L, 100 mg). Dopo la somministrazione dei prodotti, le colture sono state tenute altre 48 h a 30°C in agitazione. Le biotrasformazioni vengono seguite per TLC e vengono fermate dopo 24 o 48 h (vedi Tabella 3). La miscela di reazione viene acidificata con HCl concentrato ed estratta con etile-acetato. La fase organica viene cromatografata su silice utilizzando come solvente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2 o, ove necessario, variando le proporzioni. I risultati delle biotrasformazioni vengono riportati in Tabella 3a-c.

**Tabella 3a.** Biotrasformazioni di acido iodesossicolico **1a****1a**

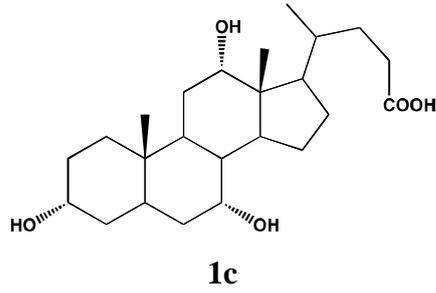
<b>battere</b>	<b>Tempo</b>	<b>Acido 3-cheto iodeossicolico</b>	<b>Non identificato</b>
MM B2	7g	80%	
MM B4	7g		20%
MM B5	7g	85%	
MM B7	7g	90%	
MM B9	7g	50%	
MM B13	7g	97%	
MM B14	7g		Vari prodotti*
MM B15	7g	96%	
MM B17	7g	60%	
MM B19	7g	70%	
MM B20	7g	98%	
MM B21	7g	63%	

\* verranno trattati in una preparativa singola

**Tabella 3b. Biotrasformazioni di acido desossicolico 1b****1b**

<b>battere</b>	<b>Tempo</b>	<b>Acido 3-cheto deossicolico</b>	<b>Non identificato</b>
MM B4	48h	10%	
MM B5	48h	35%	
MM B7	48h	15%	
MM B9	48h	12%	
MM B14	7g		Vari prodotti*
MM B15	48h	90%	
MM B17	48h	23%	
MM B19	48h	15%	
MM B20	48h	18%	

\* verranno trattati in una preparativa singola

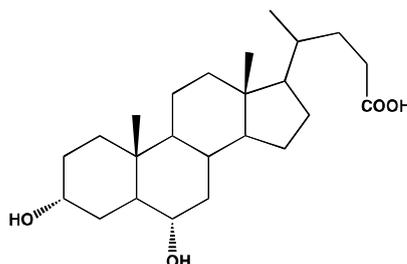
**Tabella 3c.** Biotrasformazioni di acido colico **1c**

<b>battere</b>	<b>Tempo</b>	<b>Acido 7-chetocolico</b>	<b>Acido 3,7 dichetocolico</b>
MM B2	48h	25%	
MM B5	48h		32%
MM B6	48h	35%	
MM B15	48h		70%

## Biotrasformazioni di funghi su scala preparativa. Procedura generale

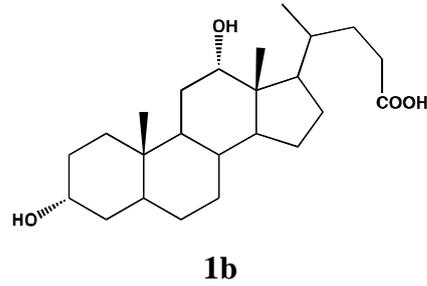
Vengono preparate colture dei funghi che da analisi TLC hanno dato i risultati più interessanti su terreno liquido Sabouraud (100 ml in beute da 250 ml) usando come inoculo un prelievo fatto con un'ansa sterile dagli strisci. Dopo 5 g di crescita a 30°C in agitazione (100-110 rpm) si inoculano i vari substrati come sali sodici (1g/L, 100 mg). Dopo la somministrazione dei prodotti, le colture sono state tenute nelle stesse condizioni monitorando le biotrasformazioni per TLC. Le cellule vengono separate per filtrazione, la miscela viene acidificata con HCl concentrato ed estratta con etile-acetato. La fase organica viene cromatografata su silice utilizzando come solvente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2 o, ove necessario, variando le proporzioni. I risultati delle biotrasformazioni vengono riportati in Tabella 4a-b.

**Tabella 4a.** Biotrasformazioni di acido iodesossicolico **1a**



**1a**

<b>fungo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Acido 3-cheto iodeossicolico</b>	<b>Non identificato</b>
MM F1	7g		Vari prodotti
MM F3	7g	100%	
MM F8	7g	90%	

**Tabella 4b. Biotrasformazioni di acido desossicolico 1b**

<b>fungo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Acido 3-cheto deossicolico</b>
MM F1	7g	39%
MM F3	7g	25%
MM F6	3g	83%
MM F9	4g	38%

### Biotrasformazione di acido iodesossicolico 1a con MM B14

La biotrasformazione di acido iodesossicolico con MM B14 (caratterizzato come *Pseudomonas migulae*) è stata condotta da un preinoculo del battere in PCB (10 ml). Dopo 48h di crescita a 30°C in agitazione (100-110 rpm) si preleva 1 ml di coltura e si inocula in 100 ml dello stesso terreno. Dopo altre 72 h di crescita nelle stesse condizioni si aggiungono 100 mg di iodesossicolato sodico (polvere) e si prelevano campioni a tempi stabiliti per monitorare la biotrasformazione mediante TLC (eluente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2). Dopo 72 h le cellule vengono centrifugate (5000 rpm per 20 min) e il surnatante viene acidificato (pH 1) con HCl conc. ed estratto con etil acetato (3 X 50 ml).

La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e il solvente rimosso al rotavapor.

Dopo separazione con TLC preparativa di silice (2mm, eluente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2) si ottengono i seguenti prodotti:

L'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-osso-col-1,4-dien-24-oico **5a** (12 mg, 13 %): <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) picchi selezionati:  $\delta$  0.80 (s, CH<sub>3</sub>-C18); 0.98 (d,  $J$  = 7 Hz, CH<sub>3</sub>-C21); 1.25 (s, CH<sub>3</sub>-C19); 4.42-4.53 (m, H-C6); 6.2 (dd,  $J$  = 10, 2.1 Hz, H-C2); 6.41 (s, H-C4); 7.25 (d,  $J$  = 10 Hz, H -C1).<sup>43</sup>

L'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-osso-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico **6a** (14 mg, 16 %): cristalli bianchi (metanolo/acqua) p.e. 270-272°C. IR (CHCl<sub>3</sub>, come metil estere)  $\nu_{\max}$  3360, 1720, 1650, 1610 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) picchi selezionati:  $\delta$  0.80 (s, CH<sub>3</sub>-C18); 1.19 (d,  $J$  = 6.5 Hz, CH<sub>3</sub>-C21); 1.27 (s, CH<sub>3</sub>-C19); 4.42-4.53 (m, H $\beta$ -C6); 6.22 (dd,  $J$  = 10, 2.1 Hz, H-C2); 6.43 (s, H-C4); 7.26 (d,  $J$  = 10 Hz, H-C1). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 186.6 (C3); 180.7 (C22); 174.6 (C5); 159.2 (C1); 127.6; 119.9; 68.8 (C6); 56.4; 54.0; 53.9; 45.4; 43.9; 43.8; 43.7; 40.5; 35.2; 28.3; 25.4; 23.8; 19.5 (C19); 17.6 (C21); 12.5 (C18). ESI-MS: calcolato per C<sub>22</sub> H<sub>30</sub> O<sub>4</sub>: 358.21. Trovato, m/z (% relativa al picco base) 357.27 (100) [M-H<sup>+</sup>].

L'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3,17-diosso-5 $\beta$ -col-1-ene **7a** (22 mg, 30 %): <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) picchi selezionati:  $\delta$  0.90 (s, CH<sub>3</sub>-C18); 1.0 (s, CH<sub>3</sub>-C19); 3.6 (ddd,  $J$  = 2 e 4 Hz, H-C6); 5.9 (dd,  $J$  = 10 e 1 Hz, H-C2); 7.2 (d,  $J$  = 10 Hz, H-C1); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 223.0; 202.1; 160.0; 128.1; 68.9; 53.3; 52.0; 51.0; 49.1; 41.0; 40.7; 36.9; 36.6; 34.0; 32.5; 22.6; 21.5; 14.3; 14.0.

### Biotrasformazione di acido desossicolico **1b** con MM B14

La biotrasformazione di acido iodesossicolico con MM B14 (caratterizzato come *Pseudomonas migulae*) è stata condotta da un preinoculo del battere in PCB (10 ml). Dopo 48 h di crescita a 30°C in agitazione (100-110rpm) si preleva 1 ml di coltura e si inocula in 100 ml dello stesso terreno. Dopo altre 72 h di crescita nelle stesse condizione si aggiungono 100 mg di desossicolato sodico (polvere) e si prelevano campioni a tempi stabiliti per monitorare la biotrasformazione mediante TLC (eluente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2). Dopo 72 h le cellule vengono centrifugate (5000 rpm per 20 min) e il surnatante viene acidificato (pH 1) con HCl conc. ed estratto con etil acetato (3 X 50 ml).

La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e il solvente rimosso al rotavapor.

Dopo separazione con TLC preparativa (2mm, silice, eluente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2) si ottengono i seguenti prodotti:

L'acido 12 $\alpha$ -idrossi-3-osso-5 $\beta$ -colan-24-oico **2b** (19 mg, 20%), sovrapponibile al composto noto in letteratura.

L'acido 12 $\alpha$ -idrossi-3-osso-col-4-en-24-oico **8b** (20 mg, 22%): <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) picchi selezionati:  $\delta$  0.80 (s, CH<sub>3</sub>-C18); 1.02 (d,  $J$  = 7 Hz, CH<sub>3</sub>-C21); 1.23 (s, CH<sub>3</sub>-C19); 4.05 (bs, H-C12); 5.80 (s, H-C4).

L'acido 3,12-diosso-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico **9b** (22 mg, 26%): <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) picchi selezionati:  $\delta$  1.01 (s, CH<sub>3</sub>-C18); 1.23 (d,  $J$  = 7 Hz, CH<sub>3</sub>-C21); 1.25 (s, CH<sub>3</sub>-C19); 6.08 (s, H-C4); 6.22 (dd,  $J$  = 10, 2.1 Hz, H-C2) 7.25 (d,  $J$  = 10 Hz, H-C1).

### Protocollo di sequenziamento ceppo MM B14

Per poter identificare in maniera rapida e univoca l'identità del ceppo MM B14 si è deciso di sequenziare il suo DNA genomico a livello della sequenza corrispondente all'RNA ribosomiale 16S. Per far questo è stato necessario isolare il DNA genomico e amplificarlo mediante reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando inneschi oligonucleotidici in grado di appaiarsi specificamente all'rDNA 16S batterico.

Il DNA genomico del ceppo in esame è estratto utilizzando il kit "GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit" (Sigma-Aldrich) utilizzando come materiale di partenza un volume pari a 5 ml di una coltura cresciuta a saturazione fino a OD 0.8-1 in PCB.

Il DNA estratto è controllato mediante corsa su gel d'agarosio per verificarne l'integrità e quantificato grazie allo spettrofotometro BioSpec-nano (Shimadzu).

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica usata per amplificare il numero di copie di un segmento di DNA compreso tra due regioni di sequenza nota, a partire da inneschi oligonucleotidici orientati (primer) che si appaiano ad esse. La reazione consta di 3 fasi principali, che vengono ripetute ciclicamente:

- denaturazione del DNA a 94°C, per far sì che i due filamenti complementari nel DNA si dissocino;
- appaiamento dei primer oligonucleotidici specifici, ad una temperatura che dipende dal contenuto in basi dei primers stessi;
- estensione dei primers ad opera della DNA polimerasi del batterio *Thermus aquaticus* (Taq pol.), alla temperatura di 72°C, in presenza di desossinucleotidi trifosfati (dNTPs).

Gli inneschi oligonucleotidici utilizzati per amplificare il DNA relativo all'RNA ribosomiale 16S sono quelli indicati come pA e pH.<sup>44</sup>

pA: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'

pH: 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'

Questi primers sono sintetizzati da Invitrogen e corrispondono rispettivamente a PA16F e PH16R sotto indicati. Le condizioni di amplificazione sono 56°C di temperatura di appaiamento e 1 minuto di estensione a 72°C.<sup>45</sup>

Per aumentare la specificità dell'amplificazione del DNA è stata utilizzata una tecnica chiamata "step down" che consiste nell'utilizzo di temperature di appaiamento decrescenti.

In particolare, dopo un primo ciclo di denaturazione iniziale di 5 min. at 94 °C, sono stati eseguiti i seguenti cicli:

1 ciclo:	94°C	40 sec
	66°C	40 sec
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	65°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	64°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	63°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	62°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	61°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	60°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	59°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	58°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	94°C	40 sec.
	57°C	40 sec.
	72°C	1 min.
25 cicli:	94°C	40 sec.
	56°C	40 sec.
	72°C	1 min.
1 ciclo:	72°C	7 min.

La composizione della miscela di reazione della PCR è la seguente:

Componente	Volume/quantità
DNA genomico	50-100ng
DreamTaq Green PCR Master mix 2X (Fermentas) contenente 0.4mM di ciascun dNTPs, 4 mM MgCl <sub>2</sub> , DreamTaq™ DNA Polymerasi e un tampone di reazione.	10 µl/1X
primer PA16F 10µM	1.5µl
primer PH16R 10µM	1.5µl
H <sub>2</sub> O	fino a 20µl

La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem).

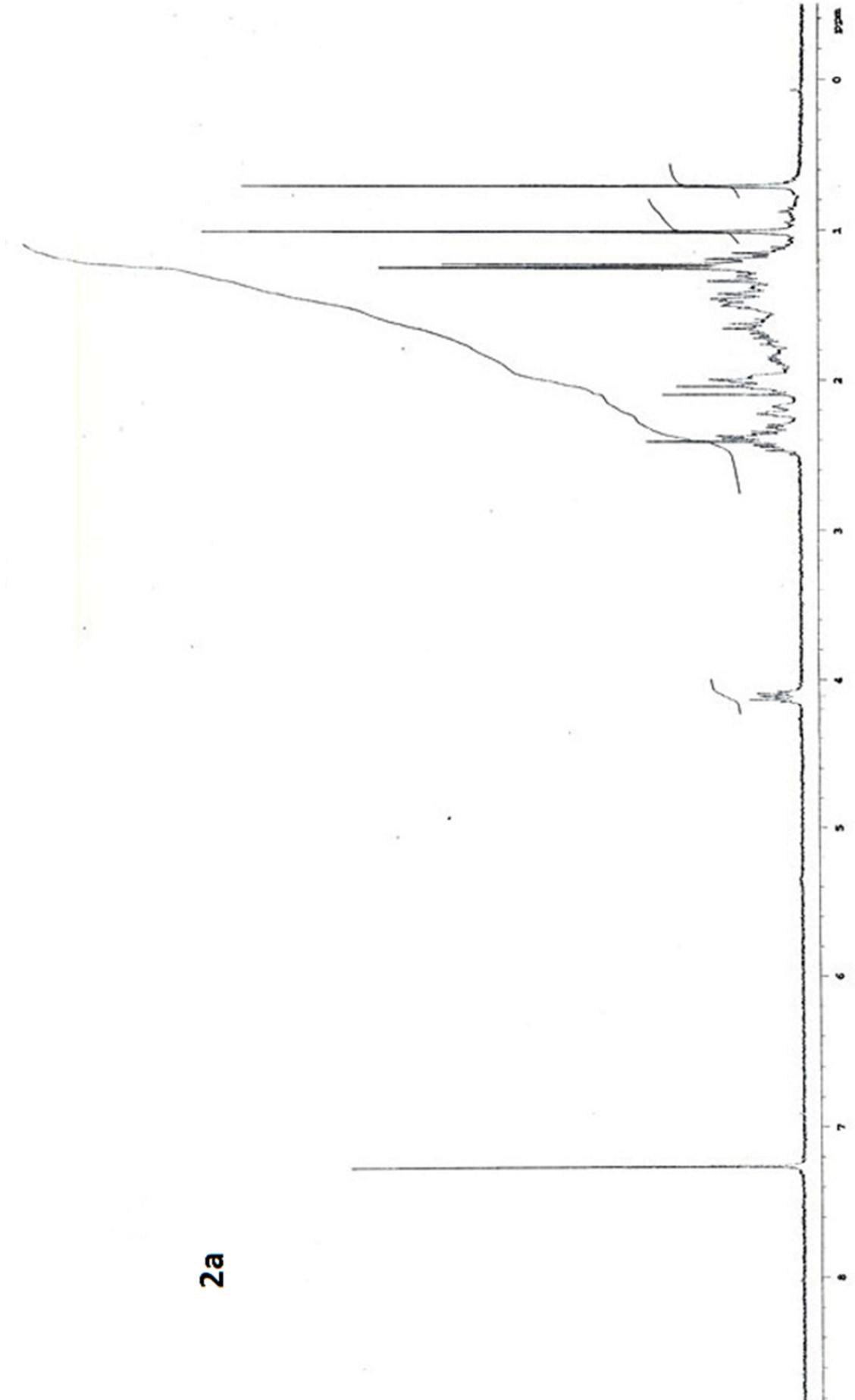
Il risultato dell'amplificazione viene controllato mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

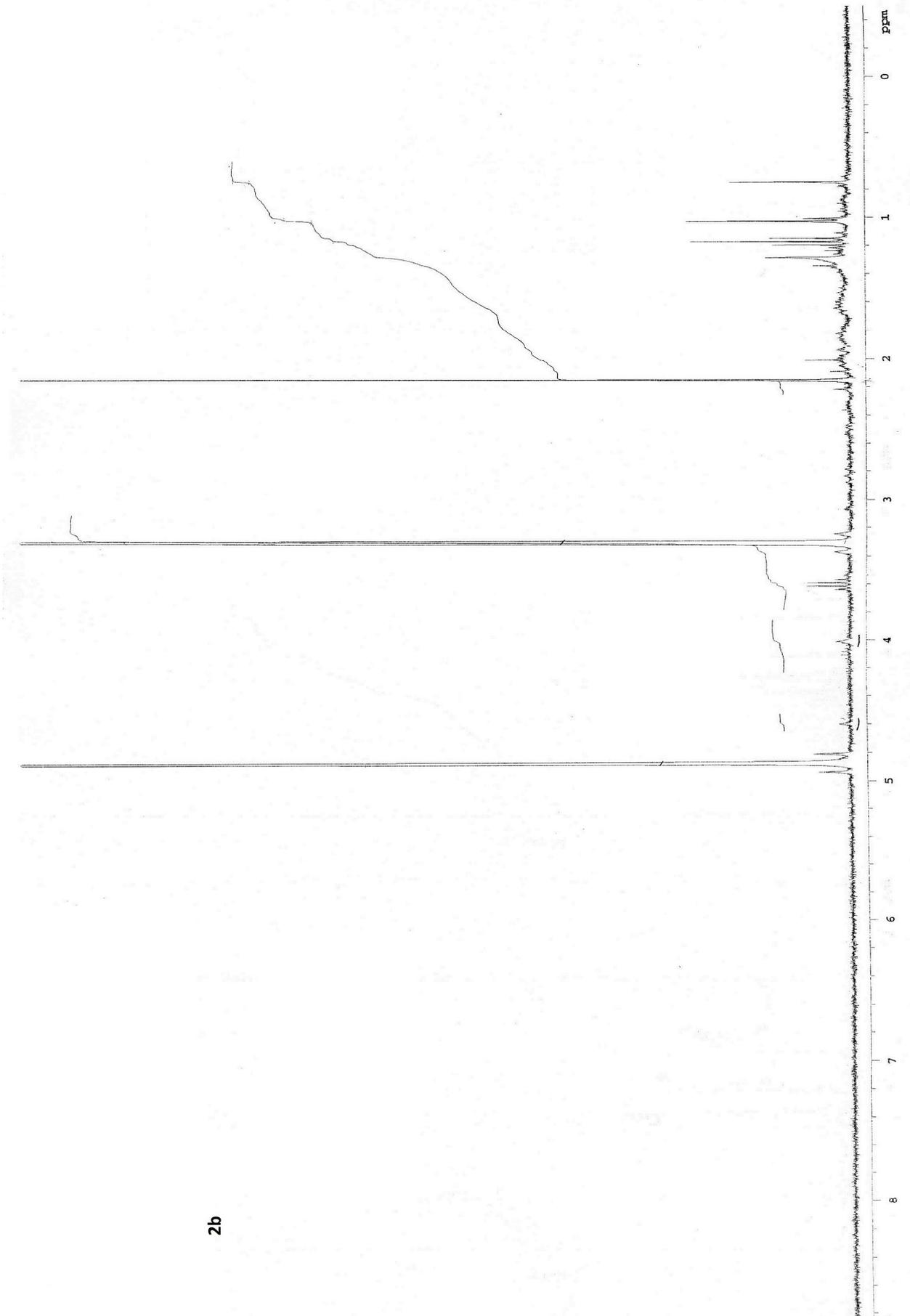
Sono state eseguite inizialmente alcune PCR preliminari utilizzando diverse quantità di DNA di partenza per ottimizzare le condizioni di amplificazione, per individuare le condizioni che consentono di avere un'elevata produzione del frammento richiesto senza altri amplificati aspecifici. Una volta individuata la concentrazione di DNA adeguata, si è eseguita un'altra PCR utilizzando un enzima TaqDNA polimerasi ad alta fedeltà e con l'attività di "correzione di bozze".

La composizione della miscela di reazione è identica a quella sopra indicata ad eccezione della DreamTaq Green PCR Master mix 2X che è stata sostituita dalla Fidelity™ PCR Master Mix 2X (USB, Affymetrix). Le condizioni di amplificazione sono identiche a quelle indicate in precedenza ad eccezione del fatto che la temperatura di elongazione non è 72°C bensì 68°C.

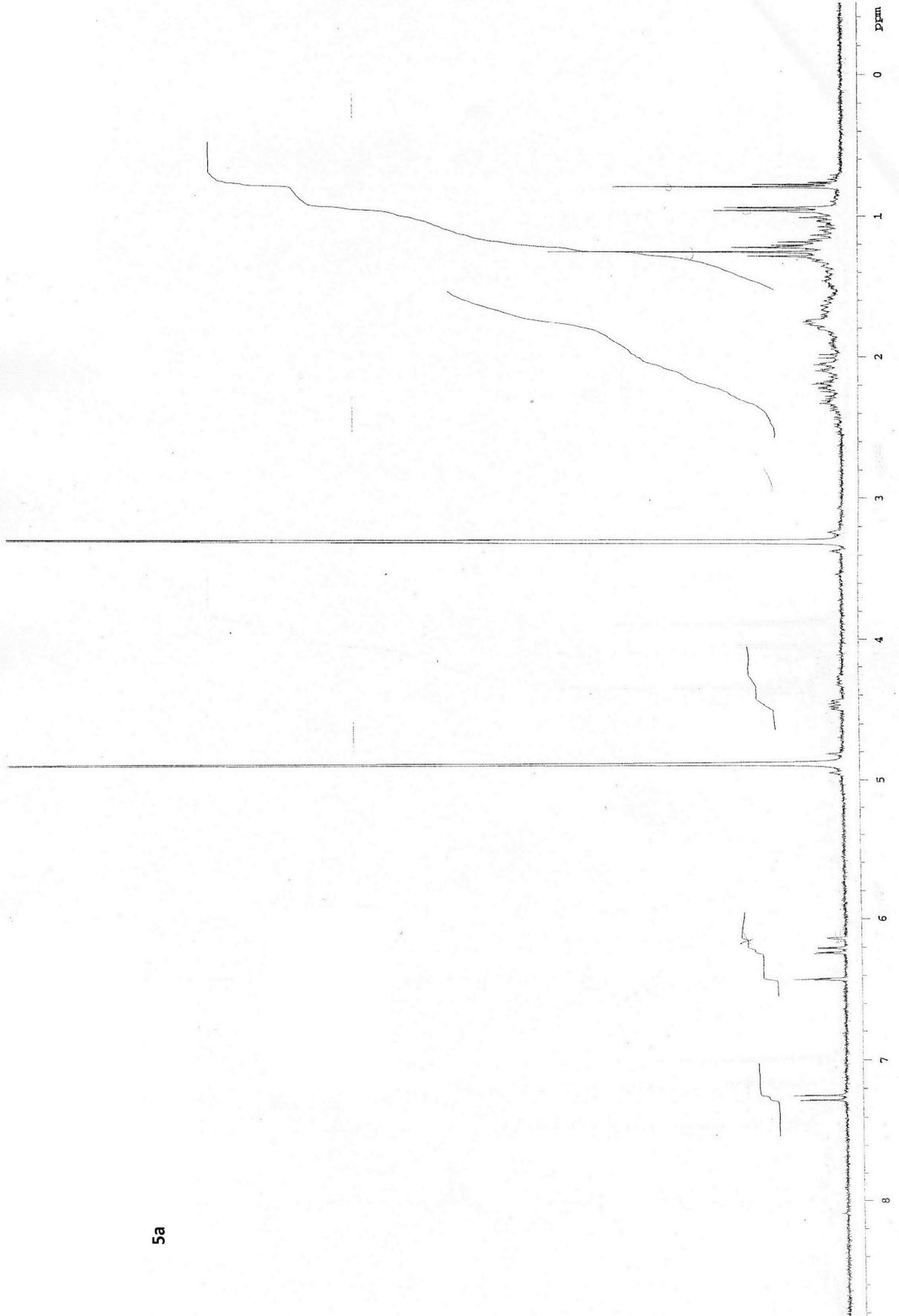
Dopo aver ottenuto l'amplificato relativo a rDNA 16S questo viene purificato dai primers e dal tampone di reazione mediante passaggio su colonna "SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns" (Sigma-Aldrich). L'amplificato purificato viene controllato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio e quantificato mediante BioSpec-nano. Un'aliquota opportuna dell'amplificato purificato (corrispondente a 60 ng di DNA) viene addizionata di 6.4 pmoli di oligonucleotide PA16F e spedita alla ditta BMR Genomics dove sarà eseguita la reazione di sequenziamento secondo il metodo di Sanger. Una volta ottenuto il cromatogramma relativo alla sequenza in esame, questo sarà controllato manualmente per

eventualmente evidenziare zone in cui la sequenza non è leggibile ed escluderle dalle analisi successive. La sequenza così ottenuta può essere utilizzata per interrogare il database BLAST (reperibile all'indirizzo: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in modo da identificare la sequenza di rDNA 16S a cui risulta più simile e quindi poter inferire l'identità del batterio di partenza.

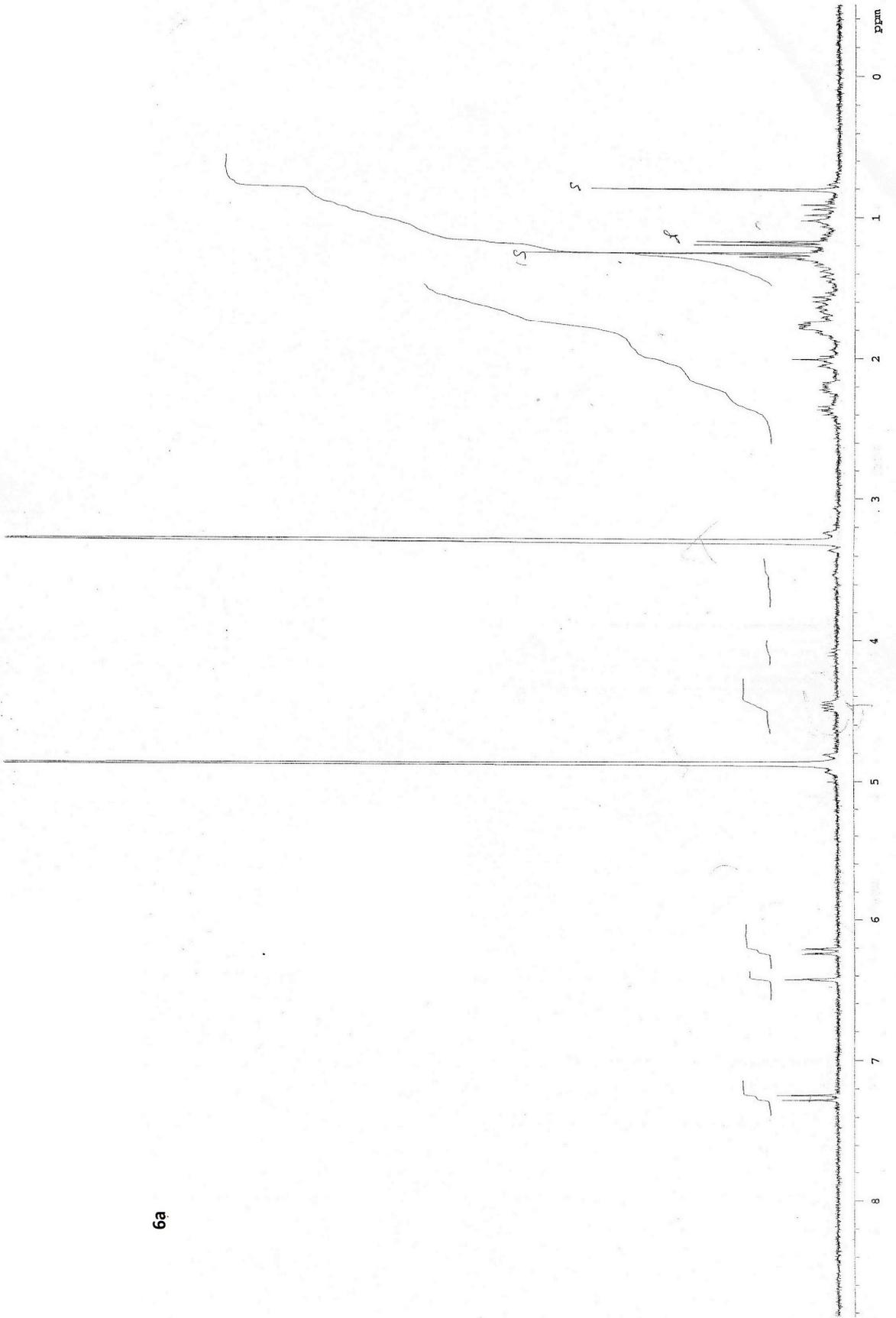


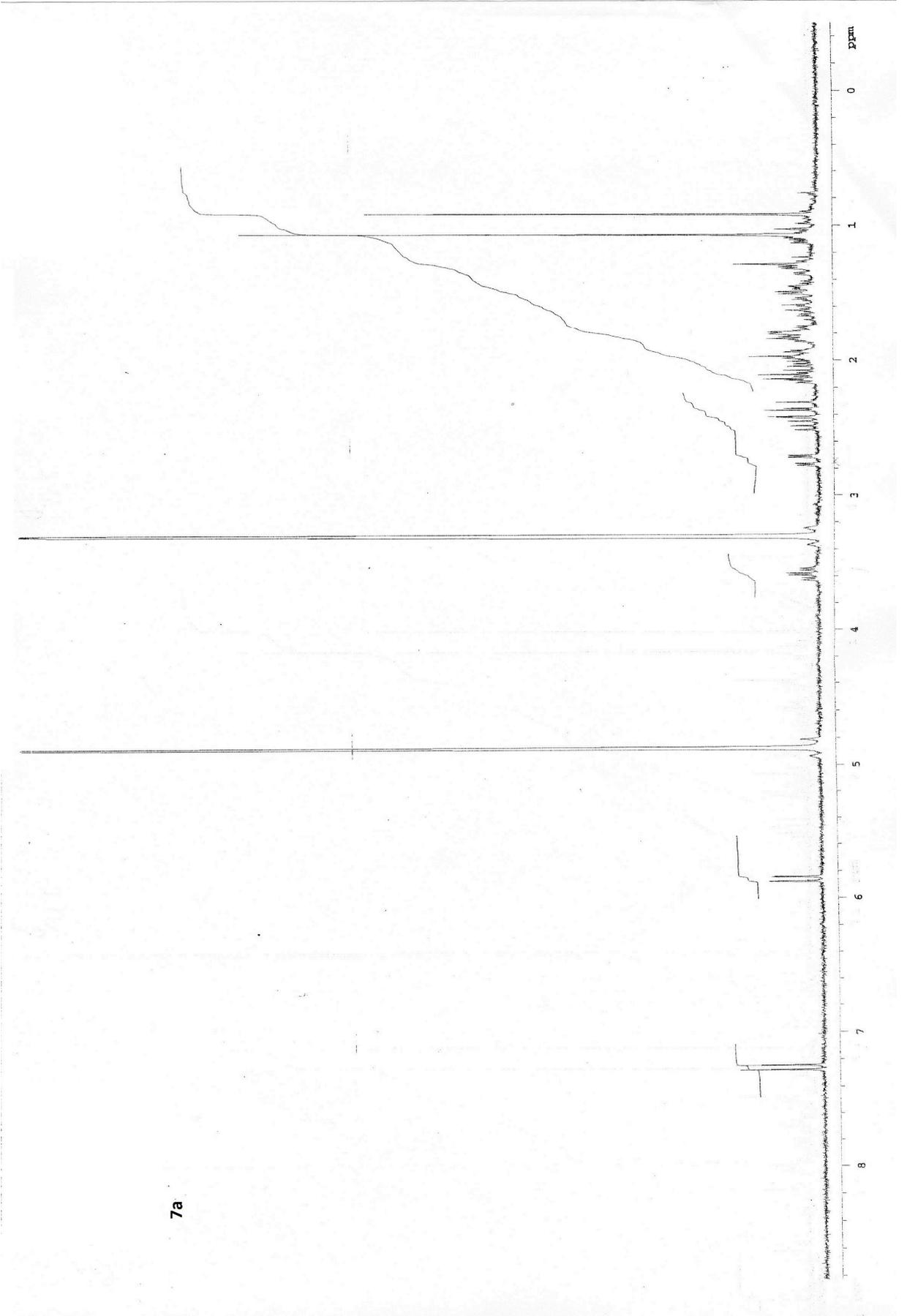


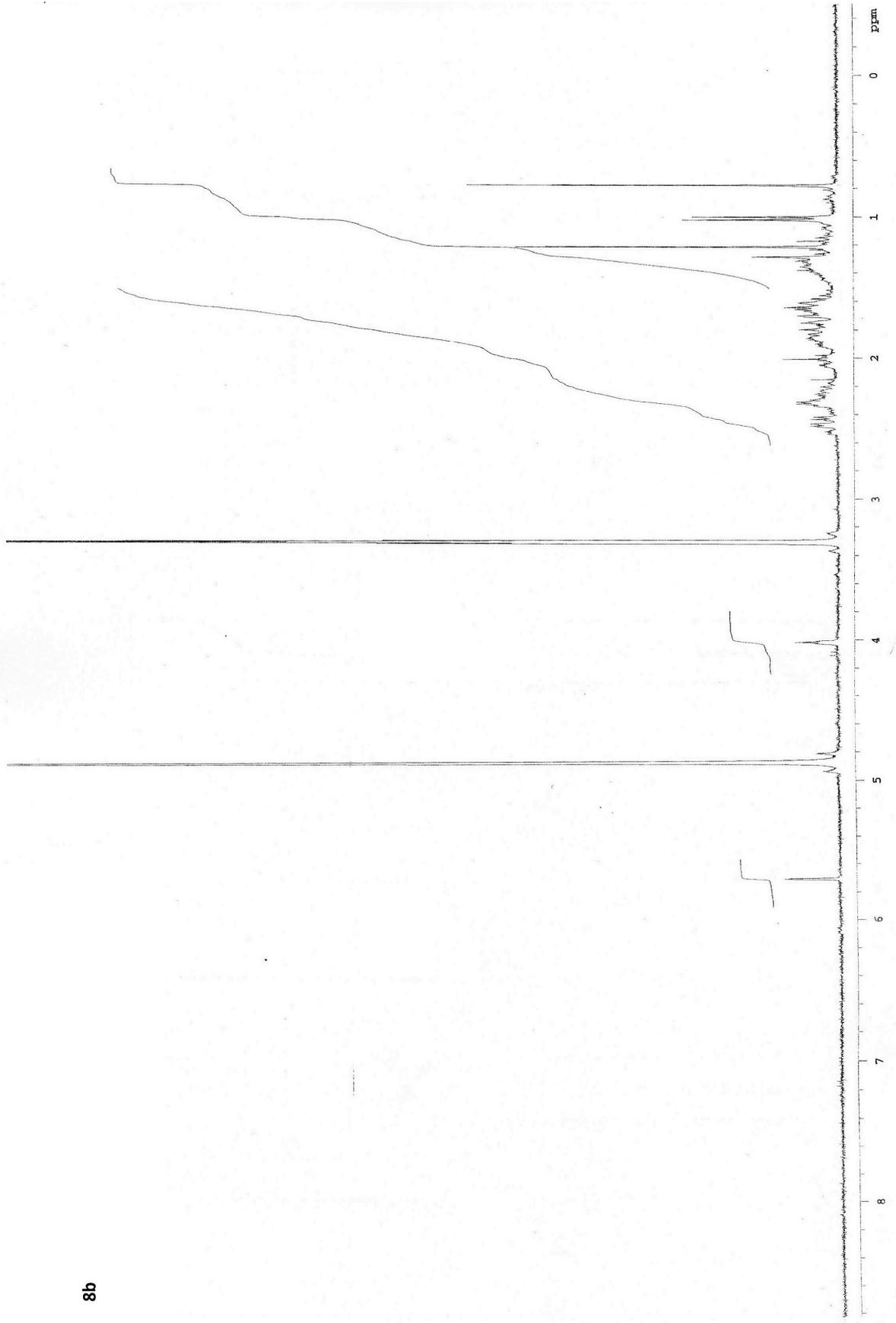
2b



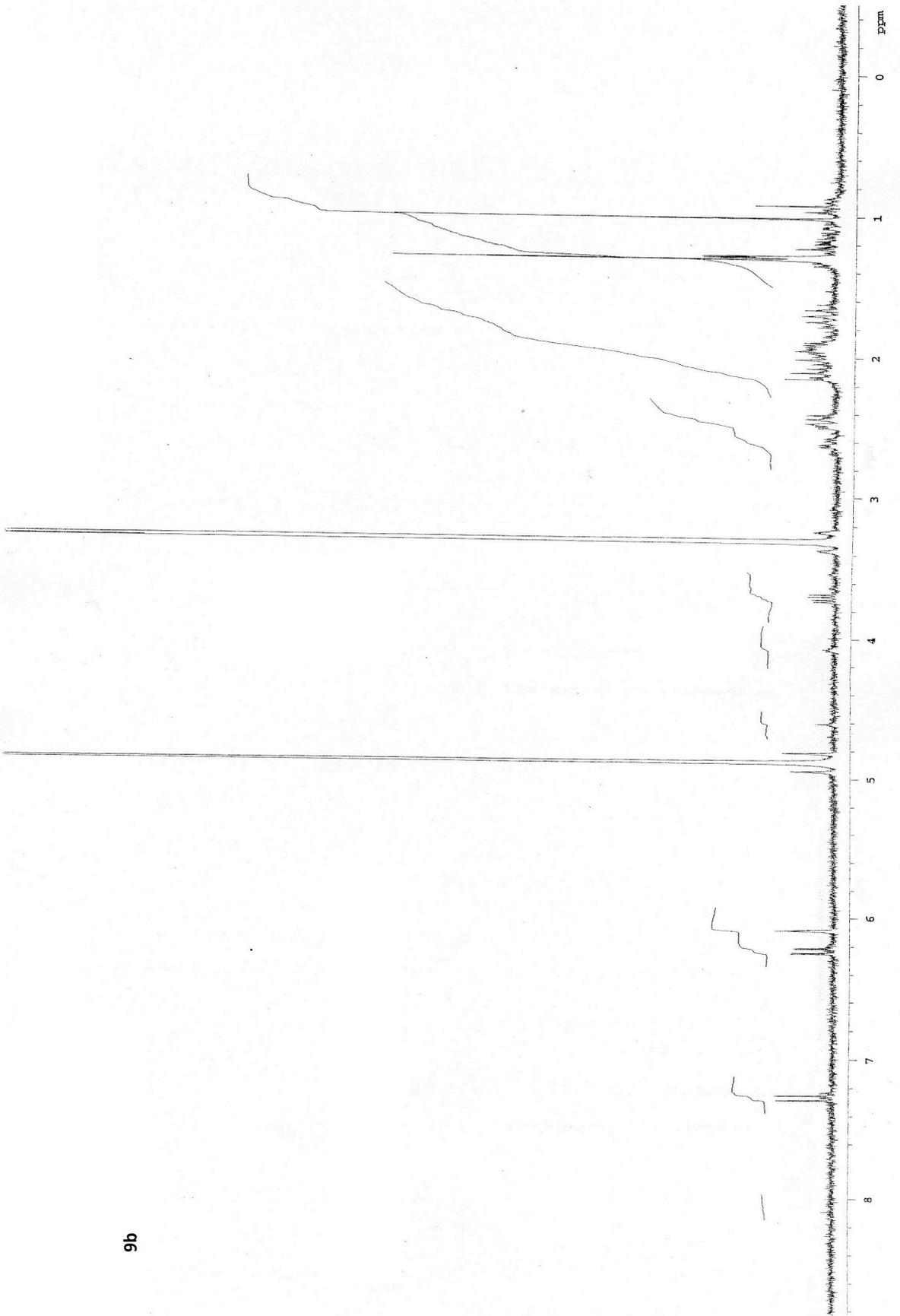
5a

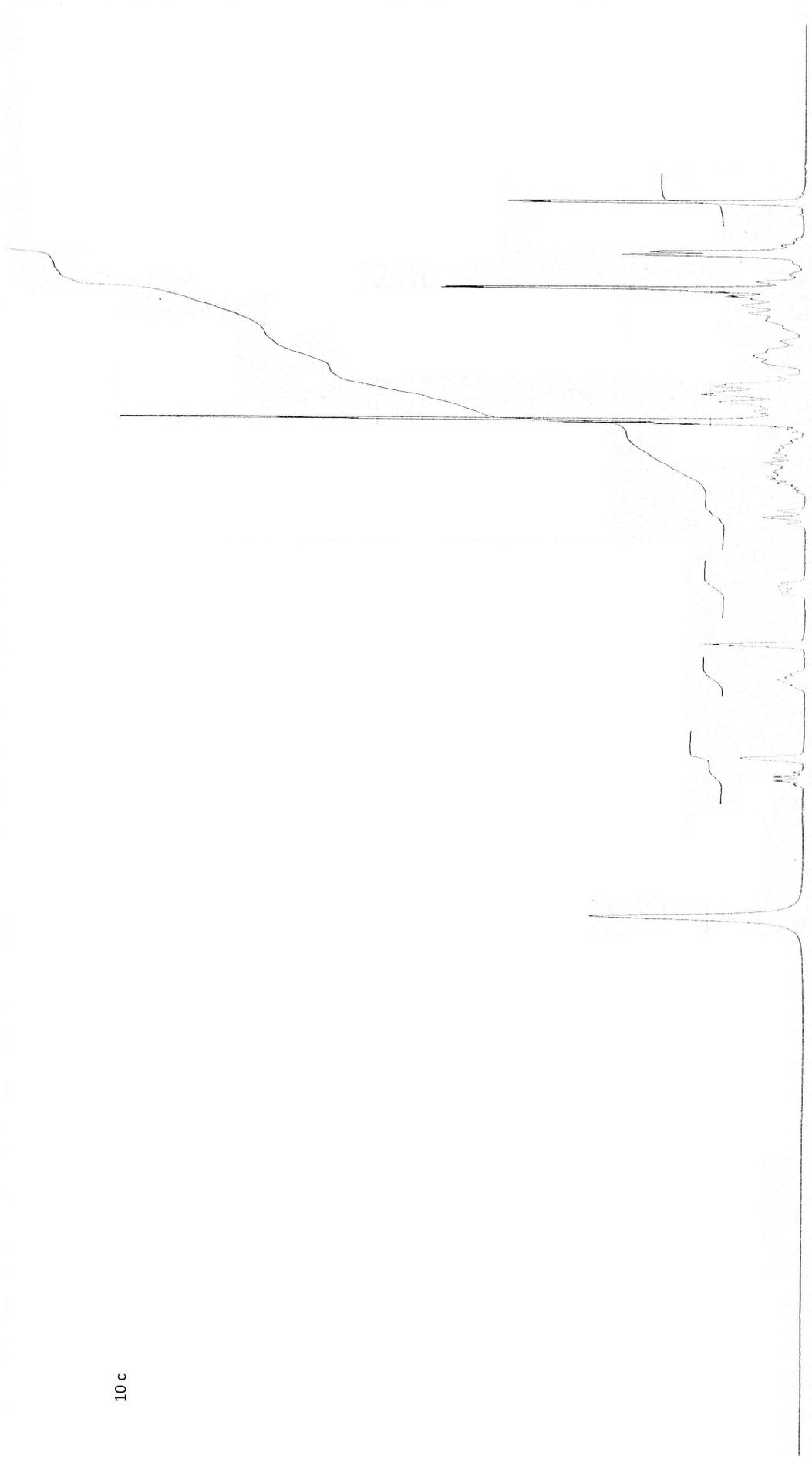






8b





10 c

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Il mio progetto di dottorato nasce all'interno della cooperazione, nata circa tredici anni fa, tra l'Università Degli Studi di Ferrara e l'Universidad Politecnica Salesiana (UPS) di Quito (Ecuador).

Lo scopo iniziale di questa collaborazione era quello di tutelare la biodiversità dell'Ecuador supportando lo sviluppo delle comunità indigene della zona (comunità Achuar della provincia di Morona – Santiago nel sud-est dell'Ecuador) fornendo strumenti e conoscenza delle potenzialità del patrimonio naturalistico della foresta amazzonica. In particolare, la popolazione indigena è stata aiutata su come poter sfruttare al meglio il territorio a scopo agricolo e sulla possibilità di utilizzare la biodiversità per ottenere materie prime di qualità per l'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica di questo paese.

A questo progetto hanno inoltre partecipato L'Università di Pavia, l'organizzazione VIS (Volontariato Internazionale per lo Sviluppo) e la Fundacion Chankuap (ONG salesiana nata per favorire lo sviluppo locale).

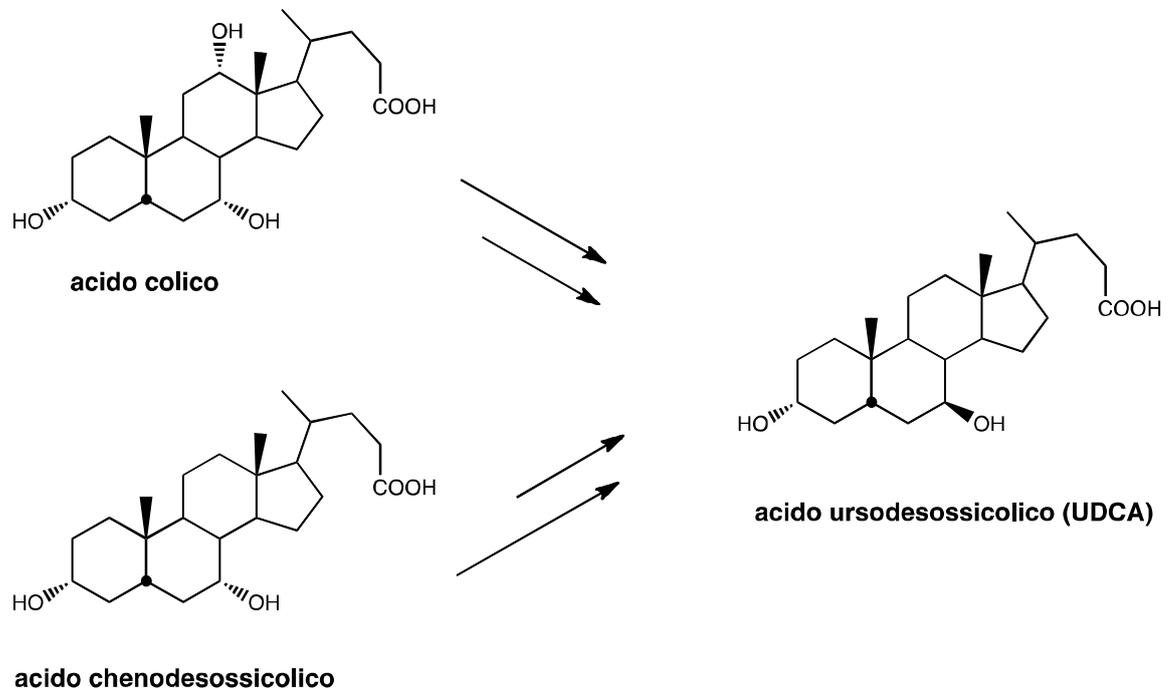
Sempre all'interno di questo progetto è stato creato un corso di specializzazione universitario sulle tecnologie dei prodotti naturali non tradizionali le cui lezioni sono state svolte presso l'UPS di Quito.

In seguito, le infrastrutture utilizzate per questo corso, sono state adibite al centro di valutazione della biodiversità (CIVABI) nato per implementare la ricerca sulle risorse naturali dell'Ecuador.

A seguito di queste prime fasi di collaborazione sono stati finanziati alcuni dottorati di ricerca per permettere così ai docenti di acquisire nuove competenze nell'ambito dell'innovazione tecnologica e di poter creare quindi un corso di laurea di III livello in biotecnologie nella stessa UPS di Quito.

Nello specifico la mia tesi di dottorato, che si inserisce nel progetto di cooperazione che riguarda il trasferimento tecnologico all'Università di Quito, si è focalizzato sulle biotrasformazioni degli acidi biliari, campo nel quale, il gruppo di ricerca del prof. Alessandro Medici dell'Università di Ferrara è al lavoro da molti anni. Dall'esigenza di trovare nuovi microrganismi che possano risultare attivi nei confronti di acidi biliari, nasce l'idea di poterli isolare in un ambiente avente un grande potenziale in termini di biodiversità quale l'Ecuador.

Gli acidi biliari estratti dalla bile bovina e suina, quali acido colico e acido chenodesossicolico, vengono utilizzati per produrre l'acido ursodesossicolico (UCDA), principio attivo che è in grado di solubilizzare i calcoli biliari sabbiosi (Schema 1).



**Schema 1**

L'impatto ambientale della sintesi di questa molecola (oggi fatta per via chimica) è piuttosto elevato dato l'utilizzo di sostanze pericolose per l'uomo e l'ambiente, quindi l'approccio biotecnologico (utilizzo di microrganismi e/o enzimi) sarebbe di grande valore industriale. Altro aspetto importante è quello del materiale di partenza, la bile, da cui si ottengono una serie di acidi biliari, considerati di scarto, in quanto fino ad oggi non si è in grado di immetterli nel ciclo produttivo di UCDA.

Per tutte queste motivazioni è molto interessante ricercare microrganismi che siano in grado di biotrasformare gli acidi biliari e di convertirli in prodotti che possono essere utilizzati come intermedi di sintesi nella produzione di UCDA o in prodotti aventi altre proprietà biologiche che possono essere sfruttate.

Poiché il progetto della mia tesi di dottorato è focalizzato sulla possibilità di valorizzare i prodotti di scarto della lavorazione della bile suina e bovina, data la collaborazione tra UPS e Università di Ferrara, si è deciso di ricercare microrganismi in grado di

biotrasformare gli acidi biliari in luoghi dove vengono trattate carni per la macellazione. Questa prima parte del progetto si è sviluppata in Ecuador.

In Ecuador, per tradizione, vengono consumate a livello alimentare anche le viscere degli animali. L'unico materiale considerato non adatto all'alimentazione umana è la cistifellea ed ovviamente il suo contenuto per il suo caratteristico sapore amaro. All'interno della cistifellea si trovano gli acidi biliari. La composizione e le quantità di acidi biliari contenuti nella bile variano a seconda della specie animale.

I macelli ecuadoregni non sono sottoposti agli stessi standard di igiene europei in quanto l'intera filiera è ancora a livello artigianale. I macelli offrono il semplice servizio di macellazione delle carni ma non i controlli di qualità. Dati questi presupposti la scelta di campionare microrganismi all'interno dei macelli ecuadoregni aumenta la possibilità di isolare ceppi adattati ad un ambiente fortemente "inquinato" e quindi potenzialmente più efficienti nella capacità biotrasformativa degli acidi biliari stessi.

Il mio lavoro è iniziato con la valutazione delle modalità di lavorazione di diversi macelli in varie province dell'Ecuador. Alla luce dei dati raccolti, si è deciso di effettuare i campionamenti nei macelli dove si effettua una lavorazione piuttosto rudimentale come il macello municipale di Latacunga (Provincia di Cotopaxi) e quello di Cayambe (Provincia di Pichincha).

Nel macello municipale di Latacunga sono stati isolati 20 batteri e 45 funghi mentre in quello di Cayambe sono stati campionati 56 batteri e 21 funghi. Tutti i ceppi sono stati selezionati aggiungendo al terreno di coltura un 5% di sale sodico di due acidi biliari l'acido desossicolico, principale prodotto di scarto della bile bovina (20%) e l'acido iodesossicolico, principale prodotto di scarto della bile suina (40%). In totale sono stati isolati 76 ceppi batterici e 66 ceppi fungini che sono stati sottoposti ad un iniziale screening biotrasformativo presso l'Università di Ferrara.

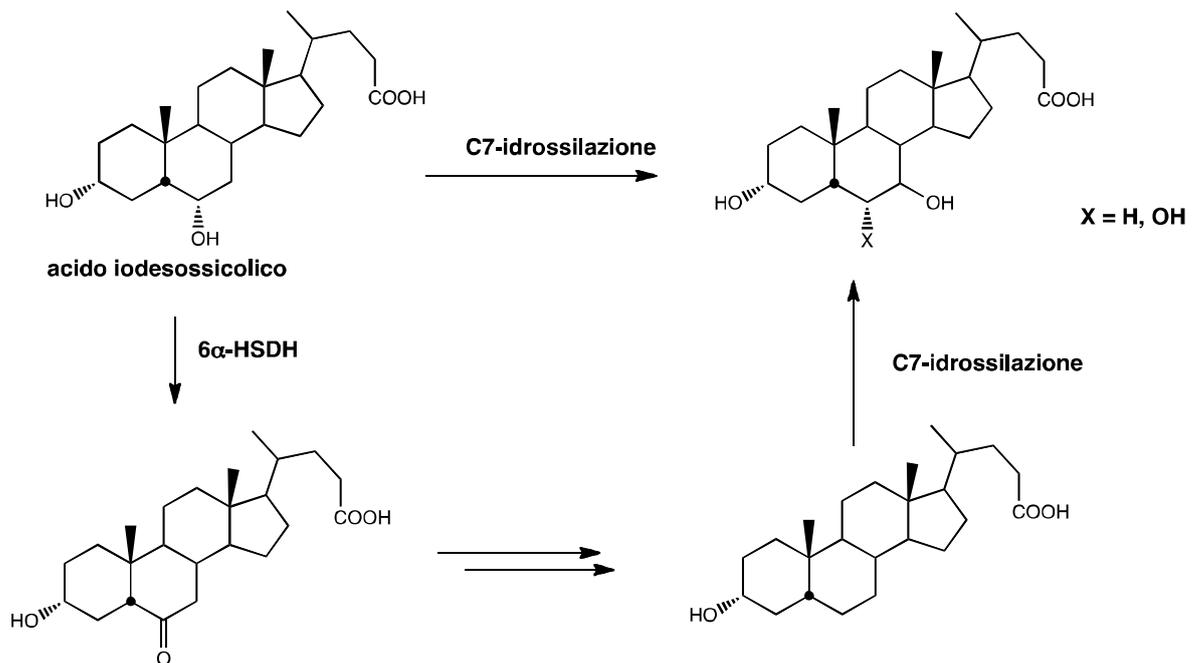
Gli acidi biliari sui quali sono stati saggiati i microrganismi sono i seguenti:

- Acido iodesossicolico, derivato della bile suina;
- Acido desossicolico, derivato della bile bovina;
- Acido colico, derivato della bile bovina.

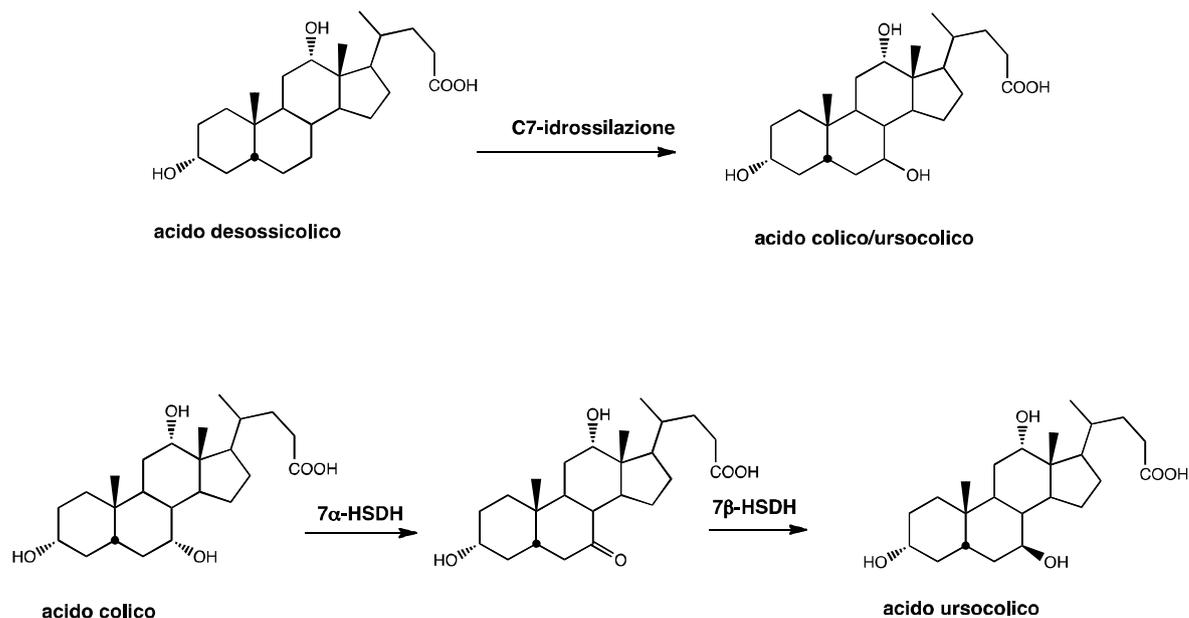
La scelta di questi tre acidi biliari è legata al loro potenziale utilizzo nel ciclo di produzione di UDCA (acido iodesossicolico e desossicolico) e alla possibilità di sostituire

la sintesi chimica di UDCA ad elevato impatto ambientale con una metodologia alternativa che utilizzi microrganismi ed enzimi.

In particolare, per quanto riguarda l'acido iodesossicolico, la reazione chiave è l'ossidazione dell'ossidrile in posizione C6 che permetterebbe la facile eliminazione della funzione C6-OH (6 $\alpha$ -idrossisteroide deidrogenasi 6 $\alpha$ -HSDH), e l'idrossilazione in posizione C7 che una volta eliminato il C6-OH trasformerebbe questo composto in acido chenodesossicolico o direttamente in acido ursodesossicolico (Schema 2).



Per quanto riguarda l'acido desossicolico la ricerca della possibile C7-idrossilazione è sicuramente la reazione più interessante in quanto permetterebbe la sua trasformazione in acido colico che è il prodotto di partenza per la sintesi di UDCA, mentre l'acido colico viene studiato per la possibile trasformazione della funzione 7 $\alpha$ -OH in 7 $\beta$ -OH dell'acido ursocolico (UCA). Questo permetterebbe di eliminare i passaggi a più alto impatto ambientale della sintesi chimica che riguardano l'inversione dell'ossidrile in posizione C7 (Schema 3).



**Schema 3**

Tutti i microrganismi (batteri e funghi) sono stati oggetto di screening su scala analitica. La biotrasformazione prevede l'inoculo dei microrganismi in 10 ml di terreno liquido PCB (batteri) o in 20 ml di terreno Sabouraud (funghi). Le colture batteriche vengono fatte crescere sotto agitazione a 30°C per 48 ore mentre quelle fungine vengono mantenute alla stessa temperatura per 7 giorni. A crescita avvenuta, viene aggiunto il sale sodico del substrato scelto in quantità tale da ottenere una concentrazione finale di 1g/L. L'incubazione continua nelle stesse condizioni per altre 48 ore. Le biotrasformazioni vengono seguite per TLC.

La maggior parte dei batteri (44 ceppi attivi su 66) si sono mostrati attivi su acido iodesossicolico **1a** e solo pochi non hanno fornito prodotti di biotrasformazione (ceppi inattivi MM B3, MM B6, MM B8, MM B11, MM B12, MM B16, MM B18, MM B22, MM B23, MM B24, MM B28, MM B29, MM B30, MM B33, MM B34, MM B37, MM B46, MM B47, MM B51, MM B52, MM B53, MM B61). Analogo risultato (39 ceppi attivi su 66) si è ottenuto per l'acido desossicolico **1b** (ceppi inattivi MM B3, MM B11, MM B12, MM B22, MM B23, MM B24, MM B27, MM B28, MM B29, MM B31, MM B34, MM B35, MM B37, MM B38, MM B39, MM B40, MM B41, MM B43, MM B47, MM B51, MM B53, MM B58, MM B60, MM B61, MM B62, MM B63, MM B64) e l'acido colico **1c** (40 ceppi attivi su 66) (ceppi inattivi MM B3, MM B7, MM B11, MM B12, MM B13, MM B22, MM B23, MM B31, MM B32, MM B33, MM B33, MM B39,

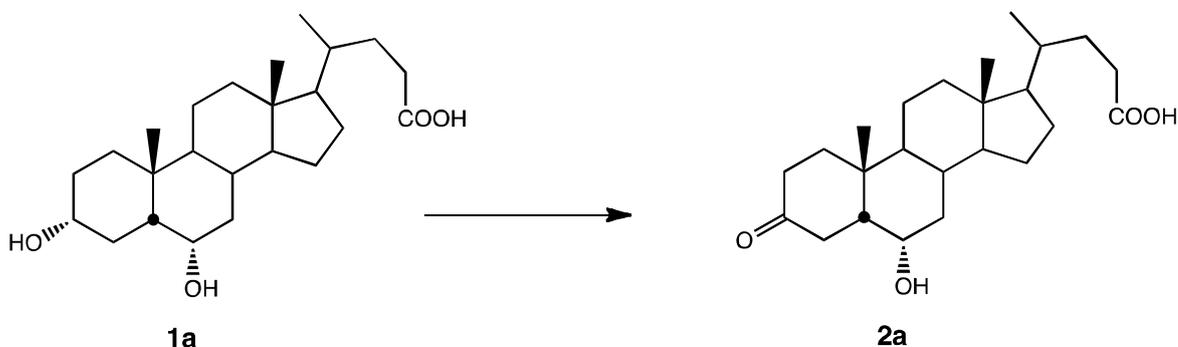
MM B40, MM B41, MM B43, MM B47, MM B50, MM B51, MM B53, MM B57, MM B58, MM B60, MM B61, MM B62, MM B63, MM B64). In alcuni casi, e questo si verifica in particolare con l'acido colico, il prodotto di partenza viene completamente metabolizzato.

Molto meno efficienti si sono dimostrati i funghi che hanno dato risultati totalmente negativi con l'acido colico **1c**. In contrasto con questo dato è quello che si ottiene dalle biotrasformazioni con l'acido desossicolico **1b** in cui circa la metà dei funghi testati (11 attivi su 27) hanno dato prodotti di biotrasformazione (ceppi inattivi MM F2, MM F4, MM F5, MM F7, MM F8, MM F10, MM F17, MM F18, MM F19, MM F21, MM F22, MM F24, MM F25, MM F26, MM F27). Un risultato intermedio è quello che abbiamo ottenuto con l'acido iodesossicolico **1a**: in questo caso solo 7 funghi su 27 danno prodotti di biotrasformazione (ceppi attivi MM F1, MM F2, MM F11, MM F12, MM F15, MM F17, MM F18, MM F19). A differenza di quanto messo in luce con i batteri, i funghi sembrano essere molto più sensibili alla struttura del prodotto di partenza. Per finire, anche per quanto riguarda i funghi alcuni ceppi metabolizzano completamente il prodotto di partenza.

Le reazioni più interessanti su scala analitica sono state ripetute su scala semi-preparativa. I prodotti sono stati separati per cromatografia e caratterizzati mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , ed in alcuni casi con spettrometria di massa (ESI-MS).

Le biotrasformazioni di acido iodesossicolico **1a** con i vari ceppi presi in esame, forniscono diversi prodotti: alcuni sono prodotti di ossidazione, altri presentano una parziale degradazione della catena in C17, altri ancora caratterizzati da una catena laterale completamente degradata.

La maggior parte dei microrganismi forniscono in rese elevate (50-98%) il 3-cheto derivato **2a**, (Schema 4, Tabella 1).



**Schema 4**

**Tabella 1.** Biotrasformazioni di **1a** a 3-cheto derivato **2a**

<b>battere</b>	<b>2a (resa%)</b>
MM B2	80
MM B5	85
MM B7	90
MM B9	50
MM B13	97
MM B15	96
MM B17	60
MM B19	70
MM B20	98
MM B21	63
MM F3	100
MM F8	90

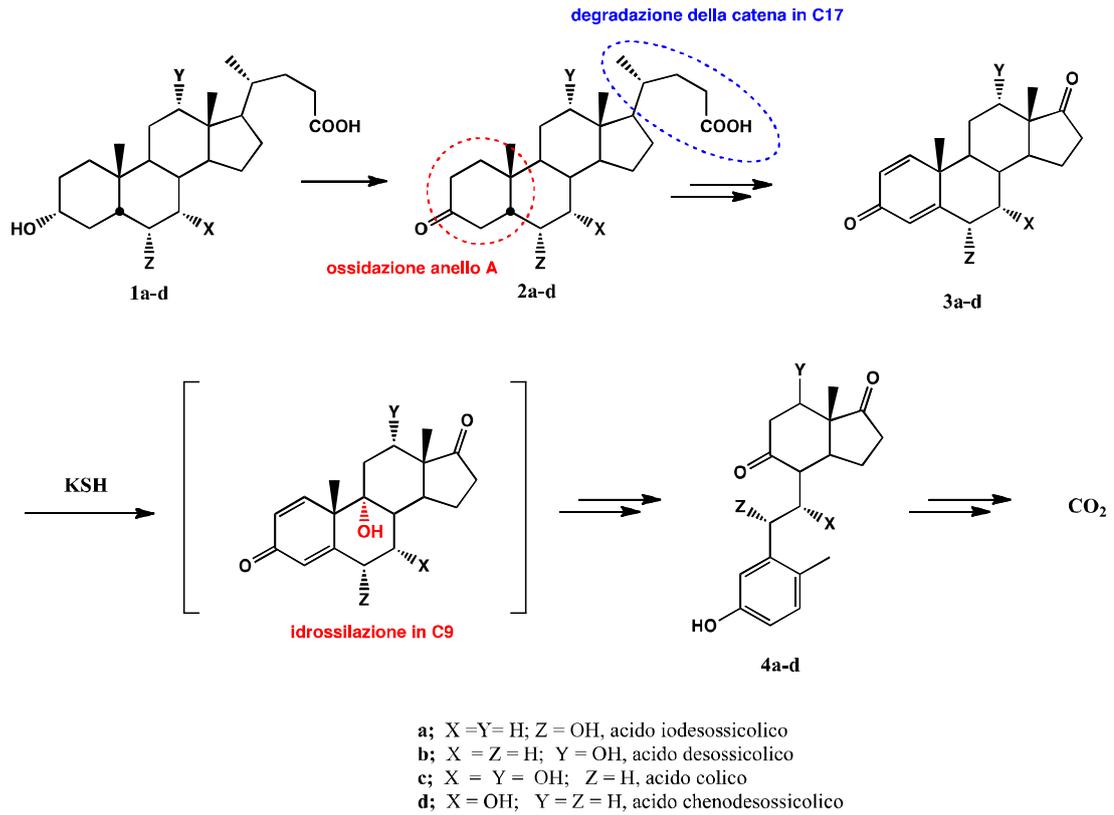
Solo il fungo MM F8 fornisce il 3-cheto derivato con rese quantitative.

Oltre ai risultati riportati in Tabella 1 biotrasformazione molto interessante si ha con il battere MM B14 che fornisce alcuni prodotti di reazione che rientrano nel processo più complesso di degradazione degli acidi biliari.

E' noto in letteratura che la degradazione aerobica degli acidi biliari procede attraverso un percorso in cui lo stadio iniziale è l'ossidazione dell'ossidrile in C3 per dare i 3-cheto derivati **2a-d**. Questi composti a seguito dalla deidrogenazione delle posizioni C1-C2 e C4-C5 e della rimozione della catena acida in C17 attraverso due  $\beta$ -ossidazioni consecutive<sup>46</sup> si trasformano negli 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) derivati **3a-d** (Schema 5). A questo punto ADD subisce l'idrossilazione in posizione C9 mediata da 9 $\alpha$ -chetosteroidi idrossilasi (KSH), una monoossigenasi contenente Fe-S.<sup>47-49</sup>

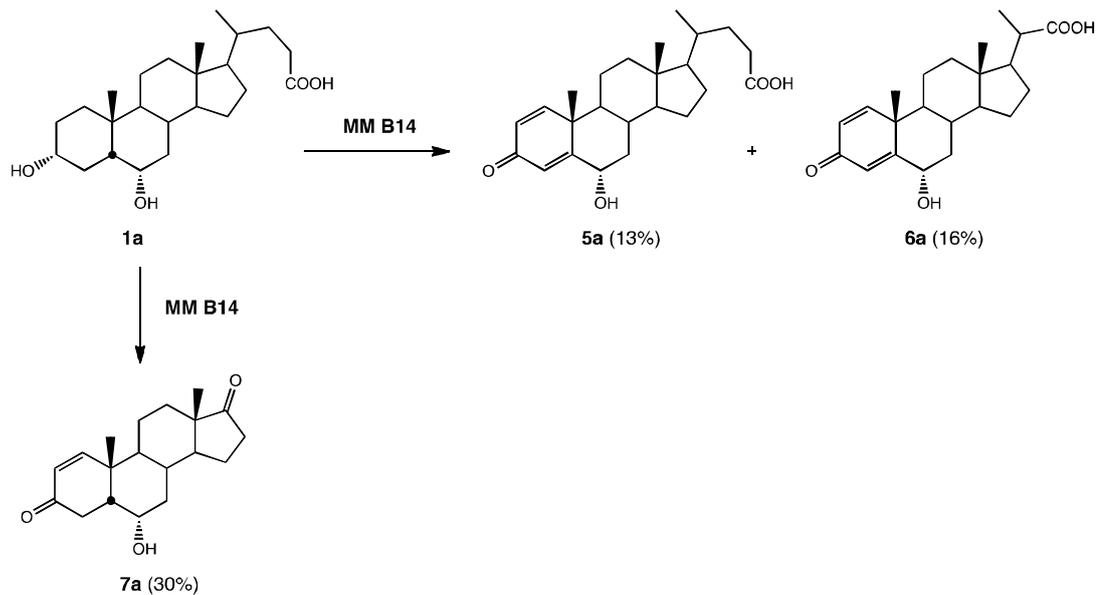
Questa reazione porta all'apertura retro-aldolica spontanea dell'anello B e si ottengono i 9,10-secosteroidi aromatici **4a-d** che successivamente possono subire degradazione totale a CO<sub>2</sub>.<sup>50</sup>

Nel nostro caso invece i prodotti che si ottengono sembrano derivare da due percorsi paralleli. Il primo procede inizialmente con l'ossidazione e la deidrogenazione dell'anello A fornendo l'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-osso-col-1,4-dien-24-oico **5a** (13%) da cui deriva l'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-osso-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico **6a** (16%) (Schema 6).



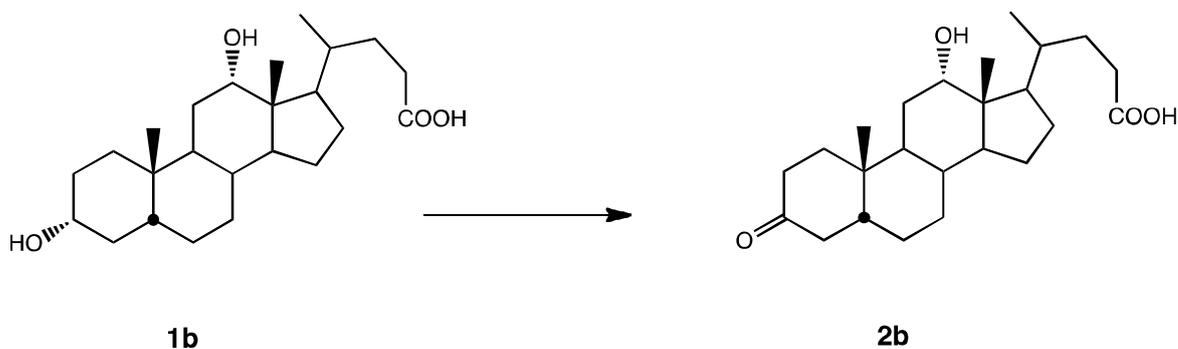
### Schema 5

Con un percorso parallelo la catena in C17 viene totalmente degradata e inizia l'ossidazione e deidrogenazione dell'anello A che porta all'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3,17-diosso-5 $\beta$ -col-1-ene **7a** in 30% di resa.



### Schema 6

Anche le biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1b** fatte in scale semi-preparativa forniscono per la maggior parte il 3-cheto derivato **2b** anche se generalmente in rese più basse (Schema 7, Tabella 2).



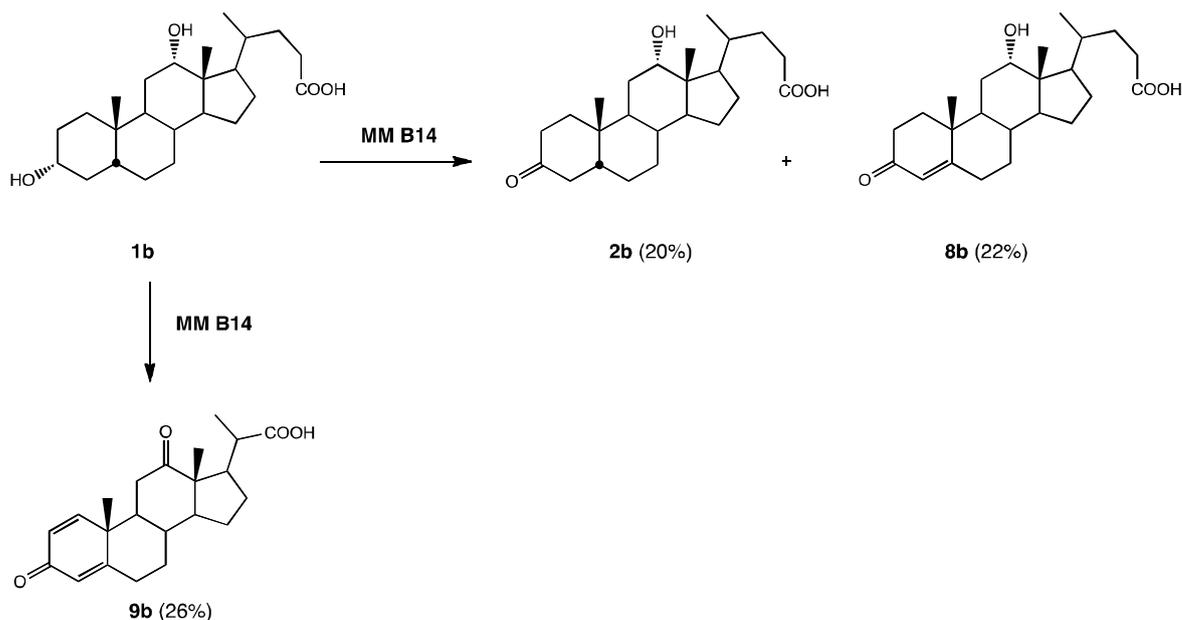
Schema 7

**Tabella 2.** Biotrasformazioni di **1b** a 3-cheto derivato **2b**

<b>battere</b>	<b>2b (resa%)</b>
MM B4	10
MM B5	35
MM B7	15
MM B9	12
MM B15	90
MM B17	23
MM B19	15
MM B20	18
MM F1	39
MM F3	25
MM F6	83
MM F9	38

Le rese più elevate si ottengono con MM B15 e MM F6, rispettivamente 90 e 83%.

Anche in questo caso il battere MM B14 con acido desossicolico **1b** fornisce una serie di composti che rientrano nel percorso metabolico di degradazione degli acidi biliari (Schema 5). In particolare la biotrasformazione fatta su scala preparativa dopo 3 giorni fornisce il 3-cheto derivato **2b** (20%), l'acido 12 $\alpha$ -idrossi-3-osso-col-4-en-24-oico **8b** (22%) e l'acido 3,12-diosso-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico **9b** (26%) (Schema 8).

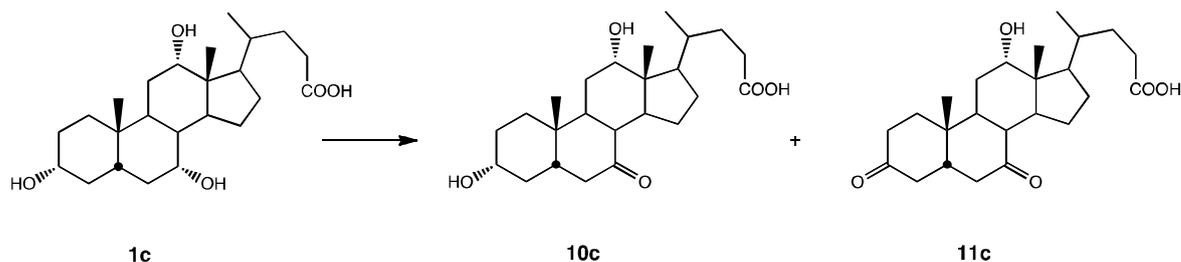


**Schema 8**

Anche in questo caso MM B14 sembra seguire due vie parallele: la prima è quella che porta alla trasformazione dell'anello A senza degradazione della catena (composti **2b** e **8b**), la seconda insieme alla parziale degradazione della catena in C17 procede con l'ossidazione degli ossidrili in C3 e C12 e con la deidrogenazione dell'anello A (composto **9b**).

Data la sua attività nei confronti di **1a** ed **1b**, MM B14 è stato caratterizzato sequenziando il suo DNA genomico a livello della sequenza corrispondente all'RNA ribosomiale 16S. Questa parte è stata seguita dal Dr. Bernacchia e dalla Dr. Valentina Venturi del Dipartimento di Scienze della vita e Biotecnologie. Dai dati sperimentali, MM B14 risulta essere *Pseudomonas migulae*.

Infine sono state ripetute in scale semi-preparativa le biotrasformazioni dell'acido colico **1c** con i batteri che avevano dato i risultati più significativi nello screening. In questo caso, come precedentemente visto, solo alcuni batteri hanno dato prodotti con rese apprezzabili come il 7-cheto derivato **10c** e il 3,7-dicheto derivato **11c** (Schema 9, Tabella 3).



**Schema 9**

**Tabella 3.** Biotrasformazioni di **1c**

<b>battere</b>	<b>10c (resa%)</b>	<b>11c (resa%)</b>
MM B2	25	
MM B5		32
MM B6	35	
MM B15		70

A differenza di quanto avvenuto per gli acidi **1a** ed **1b**, *Pseudomonas migulae* (MM B14) non da nessun prodotto di biotrasformazione.

In conclusione questo progetto di tesi ha permesso di selezionare un numero rilevante di batteri e funghi in macelli ecuadoregni ed è stato fatto un primo screening su tre acidi biliari in particolare, acido iodesossicolico, desossicolico e colico.

Molte delle biotrasformazioni sono state ripetute in scala semi-preparativa per confermare i dati di cromatografia su strato sottile. Sono stati ottenuti prodotti di ossidazione in C3 e C7 con rese molto elevate, che permettono di ipotizzare la presenza di 3 $\alpha$ -HSDH e 7 $\alpha$ -HSDH molto attive. Per il momento uno degli obiettivi più interessanti di questo progetto, l'idrossilazione in C7 dell'acido desossicolico, è stato disatteso ma si sono aperti altri scenari di possibile applicazione dei nuovi prodotti ottenuti con *Pseudomonas migulae*. I prodotti di biotrasformazione sono tutti intermedi che portano alla formazione di 9,10-secosteroidi che sono molecole note per avere interessanti attività biologiche. Lo sviluppo futuro di questo lavoro sarà ottimizzare la biotrasformazione e continuare lo studio di quei batteri e funghi che hanno consumato completamente il substrato fino a CO<sub>2</sub>.

## Bibliografia

1. G. Rosini, S. Cacchi, L. Cagliati. *Chimica delle Sostanze Naturali. Complementi di Biochimica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1971.
2. D. Kritschewsky, P. P. Nair. *The Bile Acid. Chemistry, Physiology and Metabolism*. Plenum press, New York. Volume 1, 1971.
3. M. C. Carey *Physical-chemical properties of bile acids and their salts. Sterols and bile acids*, Cap. 13, pag. 345, 1985.
4. P. B. Hylemon, D. H. Mallonee *Molecular biology of intestinal bile salt metabolism Chimica oggi* 25-29 (1991).
5. C. Casella. *Principi di fisiologia*. La Goliardica Pavese, Pavia, 1980.
6. *La bile: aspetti chimici, farmacologici e fisiopatologici*. Atti del Seminario Interdisciplinare di Studio, Bologna, 18-19 Gennaio 1985, Editi da A. Roda, E. Roda, G. D'Ascenzo, L. Barbara.
7. R. P. Bonar-Law, A. P. Davis, B. J. Dorgan. *Tetrahedron* **49**, 9855 (1993).
8. Fini A., Roda A. *J. Lipid. Res.* **28**, 755 (1987).
9. Guitton. *Trattato di Fisiologia medica*. Casa editrice Piccin, Padova.
10. L. F. Fieser, S. Rajagopalan. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 5530 (1950).
11. A. F. Hofmann. *Acta. Chem. Scand.* **14**, 17-20 (1963).
12. M. Scandola "Biodegradazione dei polimeri" in Degradazione e stabilizzazione dei materiali polimerici, AIM, XVIII Convegno Scuola, 9-14 Giugno 1996.
13. M. C. R. Franssen, N. J. Walton. *Chemicals from Plants*, World Scientific Publishers, London, 277-325, 1999.
14. P. Kurdi, H. W. van Veen, H. Tanaka, I. Mierau, W. N. Konings, G. W. Tannock, F. Tomita, A. Yokota. *J. Bacteriol.* **182**, 6525-6528 (2000).
15. J. P. Grill, S. Perrin, F. Schneider. *Can. J. Biochem.* **46**, 878-884 (2000).
16. P. Pedrini, E. Andreotti, A. Guerrini, M. Dean, G. Fantin, P. P. Giovannini, *Steroids* **71**, 189-198 (2006).
17. A. Huang, B. Hu, D. Zhou. *Fudan Xuebao Ziran Kexueban* **29**, 180-188 (1990).
18. G. Fantin, S. Ferrarini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli. *Tetrahedron* **54**, 1937-1942 (1998).
19. S. Hirano, N. Masuda, H. Oda. *J. Lipid. Res.*, **22**, 735-743 (1981).

20. R. H. Archer, I. S. Maddox, R. Chong, *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 49-56 (1982).
21. E. Mukherjee, S. Banerjee, S.B. Mahato. *J. Chem. Res. (Synop)*, 416-417 (1993).
22. A. Roda, E. Roda, A. Hoffmann, *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento per il Futuro*, Ed. Masson, Milano–Italia, pag. 194, 1999.
23. E. Bianchini, N. Chinaglia, M. Dean, P. P. Giovannini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli. *Tetrahedron* **55**, 1391 (1999).
24. H. Sawada, S. Kinoshita, H. Taguchi,. *Adv. Biotechnol.* **3**, 495 (1981).
25. P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 688 (2003).
26. B. F. Drasar, in *Degradation of bile acids by human intestinal bacteria: bile salt metabolism*, L. Schiff (ed.). Charles C. Thomas. Springfield, IL, pag. 71, 1969.
27. M. J. Hill, B. S. Drasar. *Gut.* **9**, 22-27 (1968).
28. Sistemas de Información y censo Agropecuario. Base de datos. Ecuador. 2002. Disponible en: [www.mag.gov.ec](http://www.mag.gov.ec)
29. Centro de Información Bibliotecario de la ESPOL. Escuela Politécnica del Litoral. Base de datos Ecuador. 2002
30. Camal Municipal de Riobamba. Informazioni orali ottenute da: Iván Milán, Director del *Camal Frigorífico* Municipal de *Riobamba*, Ingeniero Zootecnista. 15 Agosto 2012.
31. Camal Municipal de Ambato. Informazioni orali ottenute da: Dr. Adela Ortiz (Directora del Camal Municipal de Ambato) 14 Agosto 2012.
32. Camal Municipal de Pedernales. Informazioni orali ottenute da: Dr. Walter Casquete.(Veterinario encargado del Camal Municipal de Pedernales) 6 Agosto 2012.
33. Camal Municipal de Guayaquil. Informazioni orali ottenute da: Lic. Raimundo Chedraui (Director del Camal Municipal de Guayaquil). 30 Agosto 2012.
34. Camal Municipal de Esmeraldas. Agosto 2012. H. Falla, “*Modelo de Manual de un Sistema Estándar de Procedimientos Sanitarios Operacionales (SSOP) para centros de faenamiento de ganado porcino y bovino*”, PRONACOR, Ibarra – Ecuador, pp. 22-45 (2009).
35. M. Landeta ”*Diseño de estrategias para mitigar el impacto ambiental negativo causado por los desechos sólidos y líquidos generados en camales municipales de Carchi, Imbabura, y Norte de Pichincha*” Proyecto de Titulación previo a la obtención

- del Título de Licenciatura en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ibarra – Ecuador ( 2009).
36. E. Chanatásig, I. Herrera, “*Proyecto De Factibilidad Para La Creación De Un Camal Frigorífico En La Ciudad De Latacunga Provincia Del Cotopaxi*”, Escuela Politécnica Del Ejército Sede Latacunga ESPE, Latacunga – Ecuador (2004).
  37. Camal Municipal de Cayambe. Informazioni orali ottenute da: Dr. Milton Moncayo Director del Camal, Agosto 2012.
  38. Camal Metropolitano de Quito, Información brindada por Dr. Ramiro Gonzales, Director de Producción y Faenamiento, 4 de Diciembre 2012.
  39. J. C. Arias “*Diagnostico Situacional Del Camal Metropolitano De Quito*, Universidad Tecnológica América, Quito (2010).
  40. R. Gonzalez, *Camal Metropolitano de Quito*, Novembre 2012.
  41. G. Fantin, S. Ferrarini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli. *Tetrahedron* **54**, 1937 (1998).
  42. M. D. Midtvet. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**, 1341 (1974).
  43. R.W. Owen, R.F. Bilton, *Journal of Steroid Biochemistry* **19**, 1355 (1983).
  44. R. J. Park. *Steroids* **44**, 175 (1984).
  45. M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5300 (2009).
  46. A. Birkenmaier, J. Holert, H. Erdbrink, H. M. Moeller, A. Friemel, R. Schoenenberger, M. J. Suter, J. Klebensberger, B. Philipp. *J. Bacteriol.* **189**, 7165 (2007).
  47. Y. Hu, R. van der Geize, G. S. Besra, S. S. Gurcha, A. Liu, M. Rohde, M. Singh, A Coates. *Mol. Microbiol.* **75**, 107 (2010).
  48. J. K. Capyk, I. D'Angelo, N. C. Strynadka, L. D. Eltis. *J. Biol. Chem.* **284**, 9937 (2009).
  49. U. Edwards, T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, E. C. Böttger. *Nucleic Acids Res.* **17**, 7843 (1989).
  50. A. M. Rodas, S. Ferrer, I. Pardo. *System. Appl. Microbiol.* **26**, 412 (2003).

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio: Alessandro Medici, Paola Pedrini, Giancarlo Fantin, Alessandra Guerrini, Stefania Costa, Valentina Venturi, Irene Rugiero, per il loro sostegno accademico e per la loro amicizia, gli amici del Dipartimento di Biologia che mi hanno sempre accolto. Ai colleghi di lavoro del Area di Scienze della Vita, dell'Università Politecnica Salesiana di Quito in Ecuador.

All'Università Politecnica Salesiana, per avermi dato il sostegno per raggiungere questo traguardo e la Secretaria Nacional de Educación Superior, Tecnología e Innovación (Senescyt) de Ecuador, per aver finanziato questo lavoro ed avermi dato l'opportunità di realizzare questo progetto di dottorato.