



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología

**Identificación de ramnolípidos producidos por
Pseudomonas aeruginosa 6k-11 contenidos en halos
revelados en agar CTAB/MB con UPLC – MS/MS**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Gustavo Miguel CALLEJA AYALA

ASESOR

Susana Mónica GUTIÉRREZ MORENO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Calleja, G. (2016). *Identificación de ramnolípidos producidos por Pseudomonas aeruginosa 6k-11 contenidos en halos revelados en agar CTAB/MB con UPLC – MS/MS*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

1057



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

16-
93

Siendo las 16:10... horas del 29 de agosto de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **GUSTAVO MIGUEL CALLEJA AYALA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 001-EAPMP-2016, el titulado expuso su tesis: **"IDENTIFICACIÓN DE RAMNOLÍPIDOS PRODUCIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 CONTENIDOS EN HALOS REVELADOS EN AGAR CTAB/MB CON UPLC-MS/MS"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20... calificativo: SOBRESALIENTE CON MENCIÓN

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** a **GUSTAVO MIGUEL CALLEJA AYALA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 29 de agosto de 2016.

Mg. PATRICIA WOLL TOSO
(PRESIDENTA)

Dra. SUSANA GUTIÉRREZ MORENO
(ASESORA)

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(MIEMBRO)

Mg. DAN VIVAS RUIZ
(MIEMBRO)

A mis padres y a mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que directa o indirectamente me han ayudado a lo largo de este camino. A todos aquellos que mostraron interés en mí, en lo que hacía y en lo relevante que podría significar esto. Tan solo una palabra de aliento o un consejo es suficiente para sentirse capaz de conquistar sus sueños. Gracias por ayudarme a conseguir uno de los míos.

En especial, quiero agradecer a Agripina, mi madre y a Helen, mi hermana por todo el esfuerzo que hacen por mí, por ser mi mayor ejemplo. Por enseñarme a seguir adelante y levantarme de las caídas, por ser muy comprensivas y apoyarme en mis decisiones. Gracias por toda la dedicación y por todo el amor que me dan. A Daniel, mi padre, con quién nos hemos reencontrado después de 10 años. Cuando nos abrazamos fue como si no hubiera pasado ni un solo día, gracias por seguir en mi vida. Gracias por todos los consejos que me das.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por haberme dado la oportunidad de aprender, no solo sobre ciencia sino también sobre amistad, responsabilidad y competencia. A mis queridos profesores y asesores Dra. Susana Gutiérrez Moreno y Mg. Fernando Merino Rafael, gracias por todas las lecciones que me dieron, por ser grandes mentores, porque sé que siempre habrá cosas que aprender de ellos y porque aparte de ser como mis segundos padres también son unos excelentes amigos.

A mis compañeros del laboratorio LAMYBIM (S-23) de la UNMSM. Guillermo, María Gracia, Pamela, Jaime, Carmen, Karla, Elim, Christian, Jackeline, Kevin, Vivian, Eliza y Kim. Gracias por haberme apoyado en los momentos más difíciles de la realización de este trabajo, por haberme brindado su ayuda sin necesidad de pedirla, por darme consejos constantemente y por los momentos en los que nos reímos de nuestras ocurrencias fuera y dentro del laboratorio.

A Takeshi, Manuel y Diandra, quienes invirtieron parte de su valioso tiempo para entrenarme en las responsabilidades del laboratorio y también por enseñarme a trabajar con ramnolípidos. Gracias por ser excelentes maestros, y por habernos dado la oportunidad de pertenecer a un proyecto tan importante como en el que ustedes participaron, el proyecto FINCyT. Gracias por todo el gentil apoyo que me brindaron en las diferentes etapas de esta investigación.

A la Dra. Arelis Ábalos Rodríguez, quién me respondió un mensaje adjuntando un artículo que le solicité (muy relacionado a este trabajo) desde Cuba. Y a quien estaría gustoso de conocer en persona. A los profesores Álvaro Marcelo Rodríguez, PhD., M.Sc. Patricia Woll Tosso, Mg. Dan E. Vivas Ruíz y Dr. Gustavo A. Sandoval Peña por las importantes recomendaciones que me dieron para el desarrollo de este trabajo y la redacción final del mismo.

Finalmente a la Universidad Privada Antenor Orrego (Trujillo) que a través del LABINM y de los señores Mg. César Díaz, Dr. Fredy Pérez, Kevin Wilkinson, Ph.D., IgQ. Santos N. Miranda López, me han ayudado en el desarrollo de esta investigación con el único interés de incrementar el prestigio y producción científica en ambas universidades creando a su vez vínculos entre investigadores.

Esta tesis fue financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), en el marco del proyecto-contrato N°238-FINCYT-IA-2013. “Producción a escala piloto de un biosurfactante ramnolipídico a partir de una cepa nativa y/o mutagenizada de *Pseudomonas spp.* aislada de ambientes contaminados con petróleo para su uso en biorremediación”.

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
Agar CTAB/MB	Medio de cultivo sólido de agar que contiene CTAB y MB entre otros compuestos.
B#	Banda o zona de precipitación (halo revelado opaco).
C - #	Posición de un determinado carbono dentro de una cadena lipídica de un RL.
C#	Cantidad de carbonos en la cadena lipídica de un RL.
CMC	Concentración Micelar Crítica.
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil amonio.
Da	Dalton o unidad de masa atómica.
d_i	Índice de deseabilidad.
ELSD	Detector por evaporación de dispersión de luz (en sentido de técnica o equipo).
ESI	Electronebulización o " <i>electrospray</i> ".
HCl	Ácido clorhídrico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
LC	Cromatografía líquida.
m/z	Relación masa carga.
MALDI	Desorción láser asistida por matriz.
MB	Azul de metileno (<i>methylene blue</i>).
MRM	Monitoreo de reacción múltiple.
MS	Espectrometría de masas (en sentido de técnica o equipo).
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem.
MS1	En un equipo MS/MS se refiere al primer analizador.
MS2	En un equipo MS/MS se refiere al segundo analizador.
$[M+Na]^+$	Ión molecular de ESI en modo positivo.

[M-H] ⁻	Ión molecular de ESI en modo negativo.
N/m	Unidades de la TS: Newton por unidad metro.
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
PCP	Clorofenoles.
Pico base	Ión o fragmento iónico con mayor intensidad en un espectro de masas.
Q	Analizador de masas cuadrupolar.
Rha- / R	Ramnosa, fracción hidrófila de un RL.
RL	Ramno lípido (s).
RL estándar	RL comercial L510025 ALDRICH R-95M.
RL 6K-11	RL purificado a partir de <i>P. aeruginosa</i> 6K-11.
RL-CTAB-MB	Halos de acomplejamiento.
RL-CTAB-MB + HCl	Halos revelados o halos de precipitación.
S#	Separación entre bandas (halo translúcido).
TI	Tensión interfacial.
t_M	Tiempo muerto.
TNT	Trinitrotolueno.
TOF	Analizador de masas con tiempo de vuelo.
TPH	Hidrocarburos totales de petróleo.
t_R	Tiempo de retención.
TS	Tensión superficial.
UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficiencia.
UV	Detector de luz ultravioleta (en sentido de técnica o equipo).

TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	3
2.1	Contaminación ambiental por hidrocarburos en el Perú	3
2.2	Biotecnología ambiental y Biorremediación.....	5
2.3	Surfactantes y Biosurfactantes.....	5
2.4	Ramnolípidos	9
2.4.1	Estructura química y clasificación	9
2.4.2	Propiedades y características	11
2.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.6	Técnicas para el análisis de ramnolípidos.....	16
2.6.1	Prueba de revelado de ramnolípidos en Agar CTAB/MB con HCl	17
2.6.2	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	19
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
3.1	Hipótesis	29
3.2	Objetivos.....	29
3.2.1	Objetivo general.....	29
3.2.2	Objetivos específicos	29
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1	Producción de ramnolípidos.....	30
4.2	Purificación de ramnolípidos a partir de extracto crudo	30
4.3	Optimización de áreas de separación entre bandas.....	31
4.4.1	Extracción	34
4.4.2	Recuperación.....	34
4.5	Análisis instrumental UPLC-MS/MS	35
4.5.1	Separación cromatográfica	35
4.5.2	Espectrometría de masas	35
4.6	Análisis estadístico.....	37
V.	RESULTADOS	38
5.1	Optimización de áreas de separación entre bandas.....	38
5.2	Extracción y recuperación de los RL contenidos en las bandas	50
5.3	Identificación de ramnolípidos mediante UPLC-MS/MS	51
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57

6.1	Optimización de áreas de separación entre bandas.....	57
6.2	Extracción y recuperación de halos revelados	60
6.3	Identificación de ramnolípidos mediante UPLC-MS/MS	61
VII.	CONCLUSIONES	72
VIII.	RECOMENDACIONES	73
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
X.	ANEXOS	80
10.1	Anexo 1. Detalle de Halos revelados de cada combinación.	80
10.2	Anexo 2. Espectros de masas y diagramas de fragmentación de los RL detectados en la muestra RL 6K-11.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación esquemática de las 4 estructuras químicas generales de los RL.....	9
Figura 2. Modelo molecular de las fuerzas intermoleculares entre dos moléculas de di-RL.	12
Figura 3. Representación esquemática del comportamiento de un surfactante en disolución acuosa.	13
Figura 4. Halos revelados (izquierda). Detalle del esquema de un halo revelado a condiciones optimizadas (derecha).	18
Figura 5. Esquemización de una posible extracción de bandas de RL de un patrón de halos revelados en agar CTAB/MB.....	19
Figura 6. Esquema general de un sistema MS/MS con ejemplos de cada módulo en la parte inferior.....	24
Figura 7. Diagrama esquemático del instrumento ortogonal Q-TOF.....	25
Figura 8. Obtención digital de un espectro de masas	27
Figura 9. Interpretación de un espectro de masas	28
Figura 10. Distribución de experimentos según los niveles de cada factor.....	32
Figura 11. Patrón de halos revelados del RL 6K-11 en tres combinaciones (C5, C6 y C7).	38
Figura 12. Superficie de respuesta del área S1 para una concentración de agar de 17 g/L.	42
Figura 13. Superficie de respuesta del área S2 para una concentración de agar de 17 g/L.	43
Figura 14. Superficie de respuesta del área S3 para una concentración de agar de 17 g/L.....	43
Figura 15. Superficie de respuesta del área S4 para una concentración de agar de 17 g/L.....	44
Figura 16. Superficie de respuesta del área S1 para un volumen de inóculo de 30 μ L.....	44
Figura 17. Superficie de respuesta del área S2 para un volumen de inóculo de 30 μ L.....	45
Figura 18. Superficie de respuesta del área S3 para un volumen de inóculo de 30 μ L.....	45
Figura 19. Superficie de respuesta del área S4 para un volumen de inóculo de 30 μ L.....	46
Figura 20. Superficie de respuesta del área S1 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L....	46
Figura 21. Superficie de respuesta del área S2 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L....	47
Figura 22. Superficie de respuesta del área S3 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L....	47
Figura 23. Superficie de respuesta del área S3 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L....	48
Figura 24. Deseabilidad del diseño compuesto por los 4 modelos matemáticos.....	49
Figura 25. Halos revelados de RL 6K-11 con 3 áreas de separaciones (S) maximizadas.	50
Figura 26. Sustancias oleosas recuperadas de cada banda (B) pos-revelado.	50

Figura 27. Cromatograma de RL estándar. Detección de 14 tipos de RL por UPLC-MS/MS.....	53
Figura 28. Cromatograma de RL 6K-11, producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11. Detección de 14 tipos de RL por UPLC-MS/MS.....	53
Figura 29. Cromatograma de B1 con diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL.....	54
Figura 30. Cromatograma de B2 con diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL.....	54
Figura 31. Cromatograma de B3 con diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL.....	55
Figura 32. Cromatograma de B4. El diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL fue confirmado luego del análisis en conjunto con los espectros de masa.....	55
Figura 33. Comparación de las separaciones (S) entre las bandas de halos revelados de <i>P. aeruginosa</i> 6K-11 antes (A) y después (B) de un proceso de optimización	59
Figura 34. Detalle de halos revelados desde la combinación 1 (C1) hasta la combinación 6 (C6).	80
Figura 35. Detalle de halos revelados desde la combinación 7 (C7) hasta la combinación 12 (C12).	81
Figura 36. Detalle de halos revelados de la combinación 13 (C13)	82
Figura 37. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C ₈ -C ₁₀ producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	83
Figura 38. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C ₁₀ -C ₈ producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	84
Figura 39. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C ₁₀ -C ₁₀ producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	85
Figura 40. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C ₁₀ -C _{12:1} producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	86
Figura 41. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C _{12:1} -C ₁₀ producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	87
Figura 42. Espectro de masas MS/MS de los mono-RL Rha-C ₁₀ -C ₁₂ y Rha-C ₁₂ -C ₁₀ producidos por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	88
Figura 43. Espectro de masas MS/MS de los di-RL Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀ y Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈ producidos por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	89
Figura 44. Espectro de masas MS/MS del di-RL Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	90
Figura 45. Espectro de masas MS/MS del di-RL Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1} producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	91
Figura 46. Detalle del espectro de masas MS/MS del di-RL Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀ producido por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11.....	92
Figura 47. Espectro de masas MS/MS de los di-RL Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂ y Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀ producidos por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	93

Tabla 1. Registro de algunos impactos ambientales por derrame de petróleo en el Perú.	4
Tabla 2. Clasificación de los biosurfactantes de origen microbiano según su naturaleza química.	8
Tabla 3. Estructura química de los diferentes congéneres y homólogos de ramnolípidos.....	10
Tabla 4. Niveles máximos, mínimos y centrales de los factores.....	31
Tabla 5. Diseño experimental Box-Behnken para optimizar el área de separación entre bandas de RL.	32
Tabla 6. Datos de iones moleculares desprotonados para los 14 ramnolípidos más frecuentes (producido por <i>P. aeruginosa</i>), junto con diagnósticos MS/MS de iones fragmentados correspondientes a la posición del enlace éster de ramno-di-lípidos.....	36
Tabla 7. Descripción de Bandas (B) y separaciones (S) en los halos revelados de RL 6K-11.	38
Tabla 8. Cantidad de Halos según Bandas (B) y Separaciones (S) de cada combinación (C).	39
Tabla 9. Áreas de separación de las bandas de RL6K-11 para cada combinación del diseño Box-Behnken	39
Tabla 10. Coeficientes estimados para las 4 funciones de respuesta: áreas de separación. ...	40
Tabla 11. Coeficientes de correlación y desviación estándar para los modelos propuestos.....	40
Tabla 12. ANOVA para la superficie de respuesta de los modelos matemáticos propuestos. ...	41
Tabla 13. Valores óptimos de una posible solución maximizando todas las áreas de separación entre las bandas de un patrón de RL	48
Tabla 14. Valores óptimos para una adecuada separación entre las bandas de un patrón de RL revelados en agar CTAB/MB producidos por <i>P. aeruginosa</i> 6K-11	49
Tabla 15. Cantidad de sustancia oleosa recuperada por cada banda (B) pos-revelado.	51
Tabla 16. Comparación de las composiciones de RL detectados en las muestras RL estándar y RL 6K-11	52
Tabla 17. Comparaciones de las composiciones químicas y abundancias relativas de los RL detectados en las 4 bandas reveladas en agar CTAB/MB y el patrón RL 6K-11	56
Tabla 18. Porcentaje de incremento de las áreas de separación optimizadas	59
Tabla 19. Asignación de los RL identificados en la muestra RL 6K – 11	64
Tabla 20. Nuevas comparaciones de las abundancias relativas de los RL detectados en las 4 bandas reveladas en agar CTAB/MB y el patrón RL 6K-11	69

RESUMEN

El método de revelado de RL en agar CTAB/MB fue desarrollado para detectar cepas productoras de RL. Las recientes investigaciones describen que un inóculo de RL producido por *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de revelar distintos patrones de halos en donde se distinguen zonas opacas de precipitación (bandas) separadas por zonas translúcidas. Estas bandas podrían tener diferencias entre sí debido a que una bacteria puede producir distintos tipos de RL. Por ello el objetivo de este trabajo fue identificar los tipos de RL contenidos en las bandas de un halo revelado en agar CTAB/MB.

Se desarrolló una técnica para extraer RL a partir del agar CTAB/MB implementando, además, una metodología de superficie de respuesta Box-Behnken que maximizó las separaciones entre las 4 bandas de un patrón de RL producidos por *P. aeruginosa* 6K-11. Se identificaron, mediante UPLC-MS/MS, 9 congéneres de RL en la banda 1 (RC₈C₁₀, RC₁₀C₈, RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀, RRC₁₀C_{12:1}, RRC₁₂C₁₀ y RRC₁₀C₁₂), 7 en la banda 2 (RC₈C₁₀, RC₁₀C₈, RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀ y RRC₁₀C_{12:1}), 4 en la banda 3 (RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈ y RRC₁₀C₁₀) y 3 en la banda 4 (RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀).

La estructura molecular es probablemente el factor más importante en la migración de los RL puesto que se observó que la relación de la presencia de isómeros se mantiene en las cuatro bandas. Además de existir predominancia de di-RL. Se concluye que la cantidad y la diversidad de tipos de RL disminuyen en la migración de cada banda según su complejidad estructural (cantidad de ramnosas, isomería y masa) lo que comprueba las diferencias en cuanto a composición química y abundancia de los RL que se encuentran dentro de cada banda.

Palabras clave: Agar CTAB/MB, halos revelados, ramnolípidos, *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11, UPLC – MS/MS, superficie de respuesta, Box-Behnken.

ABSTRACT

The detecting RL method with agar CTAB/MB was improved to detect RL producing strains. Recent research describes a RL inoculum produced by *Pseudomonas aeruginosa* is able to reveal different patterns of halos where opaque areas of precipitation (bands) separated by translucent areas are distinguished. These bands may be different from each other because bacteria can produce different types of RL. Therefore, the aim of this study was to identify the types of content RL bands revealed a halo on agar CTAB / MB.

A technique was developed to extract RL from agar CTAB/MB also implementing a methodology of response surface Box-Behnken that maximized the separations between 4 bands of a pattern of RL produced by *P. aeruginosa* 6K-11. With which were identified by UPLC-MS/MS 9 RL congeners in the band 1 (RC₈C₁₀, RC₁₀C₈, RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀, RRC₁₀C_{12:1}, RRC₁₂C₁₀ y RRC₁₀C₁₂), 7 in the band 2 (RC₈C₁₀, RC₁₀C₈, RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀ y RRC₁₀C_{12:1}), 4 in the band 3 (RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈ y RRC₁₀C₁₀) and 3 in the band 4 (RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀).

The molecular structure is probably the most important factor in the migration of RL since it was observed that the ratio of isomers remains in the four bands. Besides existing predominance of di-RL. It is concluded that the amount and diversity of types of RL decrease in migration of each band according to their structural complexity (number of ramnosas, isomerism and mass) which proves the differences in chemical composition and abundance of RL found within each band.

Keywords: Agar CTAB/MB, halo revealed, rhamnolipid, *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11, UPLC – MS/MS, response surface, Box-Behnken.

I. INTRODUCCIÓN

En los procesos de biorremediación de áreas contaminadas con petróleo uno de los mayores problemas es que los hidrocarburos no se encuentran disponibles como nutrientes para los microorganismos debido a su baja solubilidad al agua. La aplicación de biosurfactantes (surfactantes de origen biológico) suele acelerar este proceso al emulsificar los hidrocarburos y permitir que los microorganismos degraden estos contaminantes. Dentro de los biosurfactantes más estudiados se encuentran los RL. Estos son producidos naturalmente por *Pseudomonas aeruginosa* y han demostrado ser eficaces para procesos de remediación de ambientes contaminados con petróleo y metales pesados (Pinzon y Ju, 2009; Giraldo, 2012; Tabuchi, 2014; Martínez, 2015).

A fin de conocer las propiedades químicas y remediadoras de los RL primero se debe identificar una buena cepa productora y determinar cuáles son los tipos de RL que ésta produce. Un método rápido para identificar bacterias productoras de RL es la prueba de revelado en agar CTAB/MB la cual permite visualizar halos alrededor de un inóculo o cultivo. Estos halos se forman por interacciones iónicas entre las moléculas de CTAB, MB y RL. Los RL inoculados en el medio migran hasta formar un complejo con las moléculas de CTAB y MB. Dicho complejo precipita al adicionar HCl obteniéndose una mejor visualización (revelado) (Siegmund y Wagner, 1991; Gunther IV *et al.*, 2005; Pinzon y Ju, 2009; Tabuchi, 2014).

Las recientes investigaciones reportan que del inóculo de una sola cepa de *P. aeruginosa* se pueden revelar hasta 11 zonas dentro de un halo revelado en donde se distinguen zonas opacas de precipitación (bandas) separadas por zonas translúcidas. Sin embargo no existen reportes de qué signifiquen realmente estas bandas (Tabuchi, 2014). Si bien está demostrado que *P. aeruginosa* puede producir distintos tipos de RL (Ábalos, 2010; Smyth *et al.*, 2014; Rudden *et al.*, 2015) aún no se ha establecido una relación entre la diversidad de RL y las bandas dentro de un halo revelado,

desconociéndose la naturaleza química de los RL contenidos en cada una. Es por ello que el presente trabajo tuvo por objetivo identificar los tipos de RL producidos por una cepa de *P. aeruginosa* que podrían haber estado contenidos en las bandas de un halo revelado en agar CTAB/MB.

En las investigaciones que incluyen la identificación de estas moléculas se han empleado una gran variedad de métodos de análisis siendo la cromatografía líquida la más empleada. Los equipos de cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) se han desarrollado para permitir un mayor sistema de presiones que el HPLC, mejorando la sensibilidad y reduciendo el tiempo de análisis. En la actualidad el UPLC acoplado a espectrometría de masas tándem (MS/MS) es la mejor herramienta de la química analítica con la que se puede determinar los tipos de RL (Ábalos, 2010; Smyth *et al*, 2014; Rudden *et al*, 2015).

El desarrollo de esta investigación podría determinar las diferencias que se encuentren en los halos de precipitación para darle un valor agregado a la técnica de revelado de halos de ramnolípidos con ácido clorhídrico en placas de agar CTAB/MB como un nuevo instrumento para recolectar o analizar datos de patrones de producción de ramnolípidos producidos por una cepa o simplificar el trabajo de caracterización de los mismos. Lo cual puede repercutir en la selección de un tipo de microorganismo adecuado para una producción potencialmente industrializada.

II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1 Contaminación ambiental por hidrocarburos en el Perú

La economía del Perú tiene sus cimientos en la explotación y exportación de recursos naturales, siendo el sector Minería e Hidrocarburos uno de los más importantes pues aporta más del 10% del PBI nacional (Martínez, 2015). A pesar del difícil contexto a nivel internacional, este sector, durante el año 2013, aumentó en 2.91%, con lo cual acumuló tres años de crecimiento continuo (INEI, 2014). Hasta el mes de abril del año pasado, dicha tendencia aún se mantuvo (Gestión, 2015). Sin embargo, la dependencia de estas industrias a nivel formal e informal y, la falta de un programa completamente eficaz para la protección de ambientes traen como consecuencia a la contaminación ambiental (Escalante, 2002; Martínez, 2015).

Existen altas probabilidades de que los impactos ambientales que influyen negativamente a los ecosistemas afecten directa e indirectamente al hombre. El crudo que transita por los oleoductos está compuesto por elementos tóxicos y cancerígenos como TPH, PAH y metales pesados. Cuando hay un derrame, estos componentes contaminan el agua y los sedimentos, y eventualmente pueden afectar a las cadenas tróficas. Además, los metales pesados tienden a ser bioacumulables; es decir que la concentración aumenta a lo largo de la cadena alimenticia. Así por ejemplo, para los pobladores de las zonas aledañas al río Corrientes (Loreto) los derrames de petróleo representan una gran amenaza, puesto que ellos beben el agua de este río y se alimentan principalmente de la pesca (Stoll, 2011).

La producción de petróleo en el Perú comenzó en la zona sur de la Bahía de la Cruz del área de Zorritos, Tumbes, el 2 de noviembre de 1863 (Petroperú, 2013); alcanzó su punto máximo alrededor de 1970 y a partir de 1978 se han reportado derrames de petróleo en casi todos los años. (Mundo azul, 2012; Tabuchi, 2014; El Comercio, 2016). En el presente año ya se han registrado dos derrames de petróleo.

El 25 de enero en el distrito de Imaza, Amazonas, una cantidad equivalente al contenido de más de 150 barriles impactó en sembríos de cacao y en las aguas de la quebrada Inayo contaminando al río Chiriaco, el que a su vez es afluente del río Marañón. Y el 3 de febrero en el centro poblado de Mayuriaga, distrito de Morona, Loreto, se vertieron aproximadamente mil barriles de petróleo. El petróleo llegó hasta el río Morona, el cual es otro afluente del río Marañón, desde el río Mayuriaga, a 13 Km del punto de la rotura (El Comercio, 2016; Perú 21, 2016). La tabla 1 registra algunos impactos ambientales ocasionados por derrame de petróleo en territorio peruano entre los años 1995 y 2016.

Tabla 1. Registro de algunos impactos ambientales por derrame de petróleo en el Perú.

Año	Zonas impactada por derrames de petróleo
1995	Playas de Conchán-Lima
2000	Salaverry y Río Marañón
2001	Puerto Eten-Chiclayo y Talara
2002	Talara
2004	Cajamarca, Ilo y Río Marañón
2005	Playas de Conchán-Lima
2006	Callao
2007	Talara, Bagua y Callao
2008	Torata, Tumbes y Plazapampa
2009	Río Amazonas-Barrío Florido, Talara, Pucallpa y Río Itaya-Maynas
2010	Cabo Blanco y Peña Negra, San Andres-Paracas y La Tortuga-Talara.
2011	Río Marañón-Saramurillo
2013	Lobitos-Piura y Río Utcubamba-Bagua
2014	Jaén, Loreto, Arequipa, San Martín de Porres, Zorritos y Tumbes
2015	Cantolao-Callao, Corrientes-Loreto, Bagua
2016	Río Chiriaco, Imaza-Amazonas y río Mayuriaga, Morona-Loreto

Fuente: Mundo azul, 2012; El Comercio, 2016; Perú 21, 2016. Elaboración: Propia.

La legislación peruana sostiene bajo la Ley N° 28611 (Ley General del Ambiente), la Ley N° 27446 (Ley del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental) y el D.S. N° 015-2006-EM (Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos) que se deben realizar estudios de impacto ambiental antes de iniciar un proyecto y, durante el mismo, se deben mitigar y remediar los impactos negativos ocasionados, por ejemplo, en caso de derrames de petróleo.

2.2 Biotecnología ambiental y Biorremediación

La biotecnología se define como el uso y manipulación de los sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios. La biotecnología ambiental es la aplicación de la biotecnología a la resolución, o remedio, de los problemas ambientales naturales, agrícolas y antrópicos y a la conservación de la calidad ambiental, por ello repercute en los procesos de producción y en el tratamiento de la contaminación derivada de una gestión deficiente en el manejo de productos peligrosos o de las acciones intencionadas (actos bélicos, sabotajes) o fortuitas (accidentes) relacionadas con los mismos (Rodríguez, 2005).

La biorremediación es una herramienta de la biotecnología ambiental que puede emplear el metabolismo de los organismos para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos (incluyéndolos como cofactores o como fuente de nutrientes y energía) a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. El proceso de biorremediación incluye reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales. Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado para tratar suelos, lodos, cuerpos de agua y sedimentos contaminados con hidrocarburos de petróleo (TPH y PAH), solventes (benceno y tolueno), explosivos (TNT), clorofenoles (PCP), pesticidas (2,4-D) y conservadores de madera (creosota) (Trejo, 2002).

2.3 Surfactantes y Biosurfactantes

Uno de los mayores problemas en la biorremediación de los impactos por derrames de petróleo es la reducida capacidad que tienen los microorganismos para degradar hidrocarburos. Debido a su baja solubilidad al agua, los hidrocarburos no se encuentran disponibles como nutrientes.

El uso de los surfactantes brinda un nuevo enfoque para el tratamiento de estas zonas, permitiendo elevar los índices de degradación del crudo de petróleo y sus derivados, mejorando la recuperación de este tipo de zonas afectadas (Giraldo, 2012).

El término surfactante proviene de “surfactant” que es una contracción en inglés de “surface active agent” y que se refiere a la actividad superficial o interfacial que tienen las moléculas anfipáticas (las cuales poseen una región hidrófoba y otra hidrófila) por la que son capaces de disminuir la TS y la TI entre solventes polares y apolares. Es así que estas moléculas tienen la propiedad de reducir la energía requerida para la formación de emulsiones. Entre otras propiedades de los surfactantes se encuentran el poder detergente, la habilidad humectante, la capacidad espumante y la concentración micelar crítica (CMC) (Navon-Venezia *et al.*, 1995; Mulligan y Gibbs, 2004; Sánchez, 2010).

La TS es la medida de la energía libre de una superficie por unidad de área. Un surfactante determina su eficiencia al reducirla. Así por ejemplo podría reducir la TS del agua de 72 a 35 mN/m y la TI para el agua contra el n-hexadecano de 40 a 1 mN/m. La TS se correlaciona proporcionalmente con la concentración del surfactante en el medio, hasta que la CMC es alcanzada. El sector industrial busca producir surfactantes que tienen una baja CMC, ya que esto implica usar una menor cantidad del surfactante para reducir la TS.

La aplicación de surfactantes químicos o sintéticos suele ser una alternativa bastante cómoda, económica y tradicionalmente, debido a que la gran mayoría ya han sido estudiadas, pero también son bastante contaminantes y tóxicas para el ambiente. En la actualidad la “compatibilidad ambiental” es un factor determinante en la producción de químicos industriales, por lo que se prefiere apostar por los productos biológicos. Es así como surge la alternativa de la producción de biosurfactantes. Estos son surfactantes de origen biológico (Pinzon y Ju, 2009; Giraldo, 2012; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011; Tabuchi, 2014).

Algunos microorganismos son capaces de producir biosurfactantes de forma natural a partir de una gran variedad de sustratos tales como azúcares, aceites, hidrocarburos y residuos industriales. Estos biosurfactantes microbianos son menos tóxicos y más biodegradables que los surfactantes químicos y son, incluso, mucho más efectivos y seguros en diferentes aplicaciones biotecnológicas, industriales y ambientales (Giraldo, 2012).

Los biosurfactantes son un grupo bastante diverso de biomoléculas, por lo que pueden clasificarse según: su peso molecular, su carga iónica, su origen microbiano y su naturaleza química. Profundizando en esta última se debe detallar que la porción hidrófoba de los biosurfactantes generalmente está compuesta de ácidos grasos de largas cadenas, hidroxiácidos grasos o α -alquil- α -hidroxiácidos grasos mientras que la parte hidrófila de la molécula puede ser un carbohidrato, aminoácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico o alcohol (Mulligan y Gibbs, 2004; Giraldo, 2012; Martínez, 2015).

En la tabla 2 se clasifican algunos biosurfactantes de origen microbiano agrupándolos en 5 categorías según su naturaleza química: glicolípidos; lipopéptidos y lipoproteínas; fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos neutros; compuestos poliméricos y; biosurfactantes particulados. La mayoría de todos estos biosurfactantes suelen ser aniónicos o neutrales, sólo un pequeño grupo son catiónicos debido a la presencia de grupos amino en sus moléculas.

Tabla 2. Clasificación de los biosurfactantes de origen microbiano según su naturaleza química.

Biosurfactante	Organismos	CMC	Información
Glicolípidos			
Ramnolípidos	<i>P. aeruginosa</i>	5 – 200	Son hidratos de carbono que se combinan con ácidos alifáticos de largas cadenas o ácidos grasos que se une ya sea por un grupo éster o grupo éter.
Trehalolípidos	<i>R. erythropolis</i>	4	
Soforolípidos	<i>T. bombicola</i>	0.3	
Cellobiololípidos	<i>U. zeae</i>		
Lipopéptidos y lipoproteínas			
Péptido-lípido	<i>B. licheniformis</i>	12 – 20	En general consta de un gran número de lipopéptidos cíclico unido a un ácido graso incluyendo antibióticos deca péptidos (gramicidinas) y antibióticos lipopeptídicos (polimixinas) que poseen propiedades tensioactivas notables.
Serrawettin	<i>S. marcescens</i>		
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	150	
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	23-160	
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>		
Gramicidinas	<i>B. brevis</i>		
Polimixinas	<i>B. polymyxa</i>		
Ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos			
Ácidos grasos	<i>C. lepus</i>	150	Gran cantidad de surfactantes de ácidos grasos y fosfolípidos son producidos por varias bacterias y levaduras durante el crecimiento en n-alcanos.
Lípidos neutrales	<i>N. erythropolis</i>		
Fosfolípidos	<i>T. thiooxidans</i>		
Surfactantes poliméricos			
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>		Emulsan, consta de un esqueleto de heteropolisacárido al que los ácidos grasos están unidos covalentemente (Rosenberg <i>et al.</i> , 1988). Liposan, un emulsionante extracelular, soluble en agua se compone de 83% de carbohidratos y 17% de proteína.
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>		
Mannan-lípido-proteína	<i>C. tropicalis</i>		
Liposan	<i>C. lipolytica</i>		
Carbohidrato-proteína-lípido	<i>P. fluorescens</i>	10	
Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>		
Partículas biosurfactantes			
Vesículas y fimbrias	<i>A. calcoaceticus</i>		Las vesículas extracelulares con los hidrocarburos forman una microemulsión que desempeña un papel importante en la absorción microbiana de alcanos.
Células enteras	Bacterias variadas		

Fuente: Desai y Banat, 1997; Martínez, 2015.

2.4 Ramnolípidos

Los RL son la familia de biosurfactantes más estudiados y con mayor demanda comercial, ya que tiene muchas aplicaciones como son en la industria agrícola, alimentaria, cosmética, farmacéutica, papelera, de pintura, cerámica, detergentes, minería y petrolera entre otras (Sánchez, 2010). Los estudios han determinado que pueden ser eficaces para procesos de remediación de ambientes contaminados con petróleo y metales pesados (Pinzon y Ju, 2009; Giraldo, 2012).

2.4.1 Estructura química y clasificación

En su estructura química la porción hidrófila de los ramnolípidos está compuesta por una o dos molécula de L-(+)-ramnosa. La parte hidrófoba está compuesto por una o dos cadenas de β -hidroxiácido graso, generalmente saturados, de longitud variable entre 8 y 16 átomos de carbono (C_8 y C_{16}). En la figura 1 se detalla una sub-clasificación según sus estructuras químicas generales: mono-ramno-di-lípido, mono-ramno-mono-lípido, di-ramno-di-lípido y di-ramno-mono-lípido. La tabla 3 muestra a todos los homólogos de RL identificados hasta la fecha organizados en estos cuatro grupos, detallando además sus fórmulas moleculares (F.M.) y pesos moleculares (P.M.) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011; Tabuchi, 2014; Martínez, 2015).

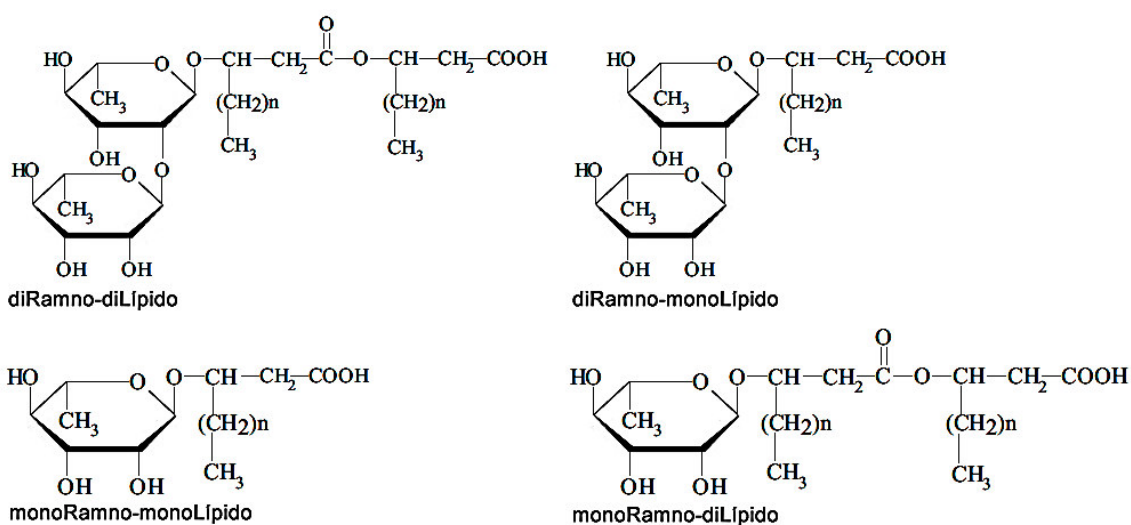


Figura 1. Representación esquemática de las 4 estructuras químicas generales de los RL.

Fuente: Smyth, *et al.*, 2014; Martínez, 2015.

Elaboración: Propia.

Tabla 3. Estructura química de los diferentes congéneres y homólogos de ramnolípidos

N°	Símbolo	F. M.	P. M.	R1	n1	n2	R2	Estructura
Mono-ramno-mono-lípido congéneres								
1	Rha-C _{8:2}	C ₁₄ H ₂₂ O ₇	302.32	H	1(-4H)	-	H	
2	Rha-C ₈	C ₁₄ H ₂₆ O ₇	306.35	H	1	-	H	
3	Rha-C ₁₀	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	334.41	H	3	-	H	
4	Rha-C _{12:2}	C ₁₈ H ₃₀ O ₇	358.43	H	5(-4H)	-	H	
5	Rha-C ₁₂	C ₁₈ H ₃₄ O ₇	362.46	H	5	-	H	
6	Rha-C _{14:2}	C ₂₀ H ₃₄ O ₇	386.48	H	7(-4H)	-	H	
Mono-ramno-di-lípido congéneres								
7	Rha-C ₈ -C ₈	C ₂₂ H ₄₀ O ₉	448.55	H	1	1	H	
8	Rha-C ₈ -C _{10:1}	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	474.58	H	1	3(-2H)	H	
9	Rha-C _{10:1} -C ₈	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	474.58	H	3(-2H)	1	H	
10	Rha-C ₈ -C ₁₀	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	476.60	H	1	3	H	
11	Rha-C ₁₀ -C ₈	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	476.60	H	3	1	H	
12	Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	C ₂₆ H ₄₆ O ₉	502.46	H	3	3(-2H)	H	
13	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	504.65	H	3	3	H	
14	Rha-C ₈ -C ₁₂	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	504.65	H	1	5	H	
15	Rha-C ₁₂ -C ₈	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	504.65	H	5	1	H	
16	Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	530.69	H	3	5(-2H)	H	
17	Rha-C _{12:1} -C ₁₀	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	530.69	H	5(-2H)	3	H	
18	Rha-C ₁₀ -C ₁₂	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	532.71	H	3	5	H	
19	Rha-C ₁₂ -C ₁₀	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	532.71	H	5	3	H	
20	Rha-C ₁₀ -C _{14:1}	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	558.74	H	3	7(-2H)	H	
21	Rha-C ₁₂ -C _{12:1}	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	558.74	H	5	5(-2H)	H	
22	Rha-C ₁₀ -C ₁₄	C ₃₀ H ₅₆ O ₉	560.76	H	3	7	H	
23	Rha-C ₁₂ -C ₁₂	C ₃₀ H ₅₆ O ₉	560.76	H	5	5	H	
24	Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₂ H ₆₀ O ₉	588.81	H	5	7	H	
25	Rha-C ₁₄ -C ₁₄	C ₃₄ H ₆₄ O ₉	616.87	H	7	7	H	
26	Rha-C ₁₄ -C ₁₆	C ₃₆ H ₆₈ O ₉	644.92	H	7	9	H	
27	Rha-C ₁₆ -C ₁₆	C ₃₈ H ₇₂ O ₉	672.97	H	9	9	H	
28	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	C ₂₇ H ₅₀ O ₉	518.68	H	3	3	CH ₃	
29	Decenoil-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₀	656.89	a	3	3	H	
Di-ramno-mono-lípido congéneres								
30	Rha-Rha-C ₈	C ₂₀ H ₃₆ O ₁₁	452.49	H	1	-	H	
31	Rha-Rha-C ₁₀	C ₂₂ H ₄₀ O ₁₁	480.55	H	3	-	H	
32	Rha-Rha-C _{12:1}	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₁	506.58	H	5(-2H)	-	H	
33	Rha-Rha-C ₁₂	C ₂₄ H ₄₄ O ₁₁	508.60	H	5	-	H	
34	Rha-Rha-C ₁₄	C ₂₆ H ₄₈ O ₁₁	536.65	H	7	-	H	
Di-ramno-di-lípido congéneres								
35	Rha-Rha-C ₈ -C ₈	C ₂₈ H ₅₀ O ₁₃	594.69	H	1	1	H	
36	Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	622.74	H	1	3	H	
37	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	622.74	H	3	1	H	
38	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₃	648.78	H	3	3(-2H)	H	
39	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	650.79	H	3	3	H	
40	Rha-Rha-C ₈ -C _{12:1}	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₃	648.78	H	1	5(-2H)	H	
41	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₈	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₃	648.78	H	5(-2H)	1	H	
42	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	676.83	H	3	5(-2H)	H	
43	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	676.83	H	5(-2H)	3	H	
44	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	678.84	H	3	5	H	
45	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	678.84	H	5	3	H	
46	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{14:1}	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704.89	H	3	7(-2H)	H	
47	Rha-Rha-C ₁₂ -C _{12:1}	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704.89	H	5	5(-2H)	H	
48	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₂	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704.89	H	5(-2H)	5	H	
49	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	C ₃₆ H ₆₆ O ₁₃	706.90	H	5	5	H	
50	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₈ H ₇₀ O ₁₃	734.95	H	5	7	H	
51	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₂	C ₃₈ H ₇₀ O ₁₃	734.95	H	7	5	H	
52	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄	C ₄₀ H ₇₄ O ₁₃	763.00	H	7	7	H	
53	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₆	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₃	791.06	H	7	9	H	
54	Rha-Rha-C ₁₆ -C ₁₄	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₃	791.06	H	9	7	H	
55	Rha-Rha-C ₁₆ -C ₁₆	C ₄₄ H ₈₂ O ₁₃	819.11	H	9	9	H	
56	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄ -C ₁₄ ^b	C ₅₄ H ₁₀₀ O ₁₅	989.36		Dibujada por separado (b)			
57	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	C ₃₃ H ₆₀ O ₁₃	664.82	H	3	3	CH ₃	
58	Decenoil-Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₄	803.03	b	3	3	H	

Fuente: Abdel-Mawgoud et al., 2011; Martínez, 2015.

Las porciones hidrófobas e hidrófilas de los RL están unidas mediante un enlace O-glicosídico. En el caso de los di-ramnolípidos (di-RL) las ramnosas se unen por un enlace glicosídico α -1,2. En el caso de los ramno-di-lípidos (R-di-L) las cadenas de ácidos grasos están unidas entre sí por un enlace éster entre el grupo β -hidroxilo de la cadena distal con el grupo carboxilo de la cadena proximal (observar figura 1 y tabla 3) (Tabuchi, 2014).

2.4.2 Propiedades y características

2.4.2.1 Interacciones de agregación intermolecular

Además de ser solubles en disolventes polares como metanol, cloroformo y éter etílico, los RL se comportan como surfactantes aniónicos en disoluciones acuosas (principalmente a valores de pH por encima de 4) debido a que poseen grupos hidroxilos y carboxílicos ionizables (Sánchez, 2010). Los RL, en estas disoluciones, pueden agregarse formando fuerzas intermoleculares entre sí. La figura 2 representa dos moléculas de di-RL unidas por estas interacciones: La región hidrófoba se mantiene principalmente por fuerzas de Van der Waals entre los grupos metileno de las cadenas acíclicas, y en la zona polar podrían existir varios puentes de hidrógeno (“a”, “b”, “c” y “d”) (Sánchez, 2010).

En el enlace “a” el grupo carboxilo de la primera molécula de di-RL (modelo de armazón de alambre) interacciona con el grupo hidroxilo del C-3 del segundo anillo de ramnosa de la segunda molécula de di-RL (modelo de barras y esferas). El enlace “b” une el grupo hidroxilo del C-4 de la primera molécula con el grupo –OH del C-3 de la segunda. Finalmente, el grupo carboxilo de la segunda molécula podría interactuar con el grupo hidroxilo del C-2 (enlace “c”) o con el hidroxilo del C-3 (enlace “d”) de la primera molécula (Sánchez, 2010).

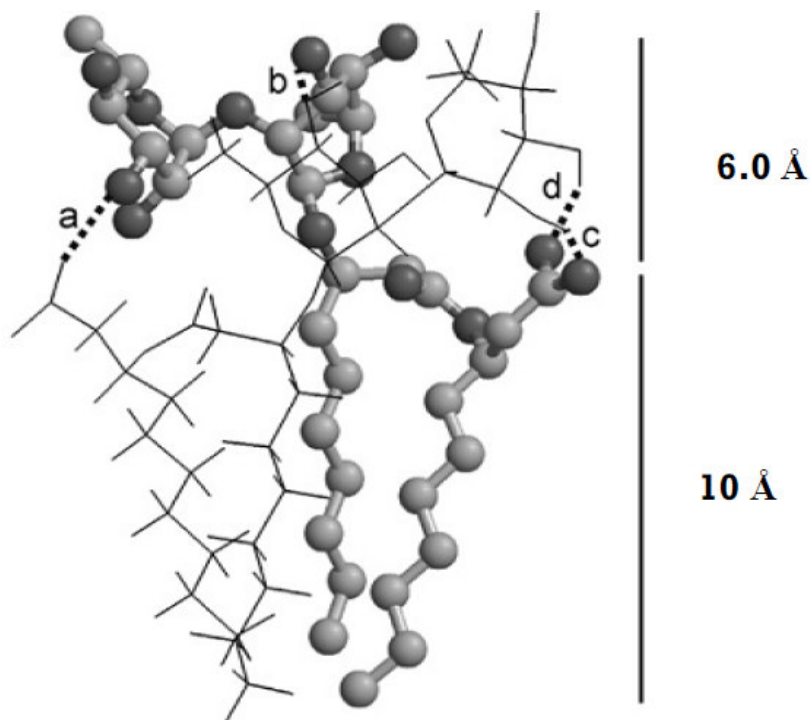


Figura 2. Modelo molecular de las fuerzas intermoleculares entre dos moléculas de di-RL. Una molécula se ha representado con armazón de alambre. Los puentes de hidrógeno se indican con líneas discontinuas.

Fuente: Sánchez, 2010.

2.4.2.2 Concentración Micelar Crítica

Una micela es una asociación polimérica de una sustancia anfipática (como los RL). En disoluciones acuosas las partes polares (ramnosas) están en contacto con el solvente y las partes apolares (lípidos) quedan inmersas en el interior de la micela en una disposición que elimina los contactos desfavorables entre el agua y las zonas hidrófobas. Las interacciones intermoleculares como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals facilitan la formación de micelas (Sánchez, 2010). La CMC se puede definir como la mínima concentración necesaria de surfactante para la formación de micelas en un determinado medio. La CMC es influenciada por el pH, la temperatura y la fuerza iónica del medio. (Sánchez, 2010; Giraldo, 2012). La figura 3 representa el efecto de la concentración de RL en la formación de las micelas y en la reducción de la TS. También se ha demostrado que los di-RL exhiben una transición de micela a vesícula al aumentar su concentración y, además, que estas vesículas son capaces de encerrar un compartimiento acuoso (Sánchez, 2010).

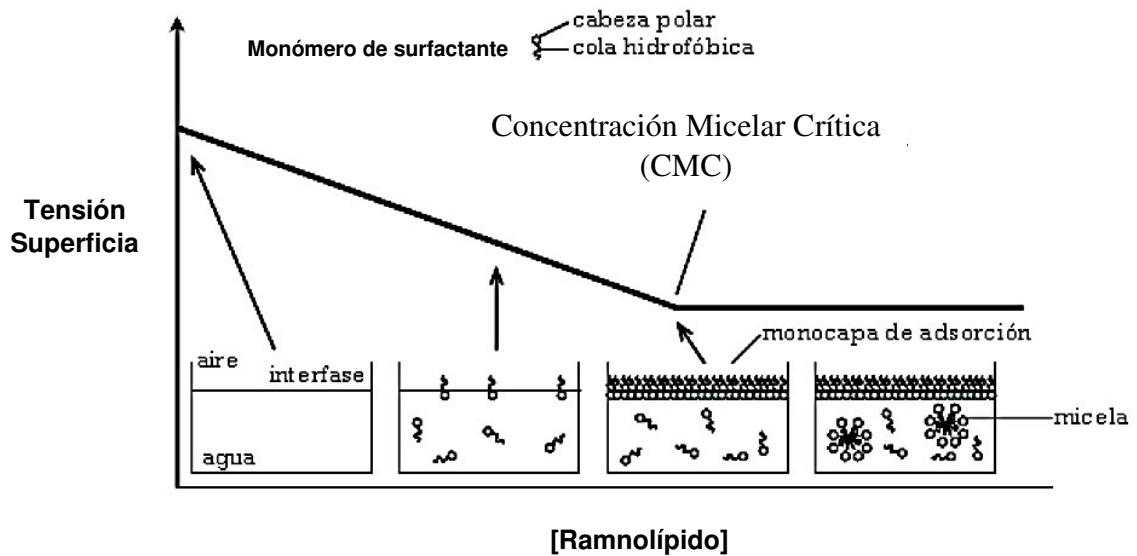


Figura 3. Representación esquemática del comportamiento de un surfactante en disolución acuosa.
Fuente: Sánchez, 2010.

Los valores de CMC de una disolución de RL son muy variables, por ejemplo, pueden reducir la TS del agua pura de 72 a menos de 30 mN/m, con una CMC en el rango de 5 a 200 mg/L (Martínez, 2015). Estos rangos en los valores de la CMC dependen del tipo de solvente y de la proporción y composición de los homólogos ramnolípídicos disueltos (Rikalovic *et al.*, 2013). Las especies más hidrófobas (que tienen doble cadena o cadenas más largas) tienen CMC menores. De esta manera se ha determinado que las especies Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ y Rha-C₁₀-C₁₀ presentan menores valores de CMC que sus congéneres menos hidrófobos Rha-Rha-C₁₀ y Rha-C₁₀ (Mata-Sandoval *et al.*, 1999). Además de la hidrofobicidad, la presencia de dobles enlaces (en estos ácidos grasos) hace que la CMC sea mayor que la correspondiente a las formas saturadas (Sánchez, 2010).

2.4.2.3 Funciones fisiológicas

Las bacterias producen RL para solubilizar ciertos sustratos en el interior de las estructuras micelares y para aumentar la hidrofobicidad de la superficie celular, provocando un incremento de la internalización de sustratos apolares como hexadecano y octadecano, e induciendo la formación de agregados multicelulares

(Sánchez, 2010). Esto suele suceder en condiciones de estrés celular, cuando el sustrato por excelencia no es hidrosoluble o el cultivo microbiano ya no es relativamente joven (finales de la fase logarítmica o en la fase estacionaria), entonces la competencia por los nutrientes es más fuerte, lo que obliga a estas bacterias a producir RL.

Los RL también presentan actividad antibacterial, antizooespórica, antifúngica, antifitopatogénica, alguicida y antiviral (Sánchez, 2010; Martínez, 2015). Además también intervienen en la formación de biofilms (Davey *et al.*, 2003), en el movimiento bacteriano (Caiazza *et al.*, 2005) y en la permeabilidad de células animales (Sánchez, 2010).

2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Las bacterias productoras de biosurfactantes pueden ser encontradas en suelos con o sin contaminación (Bodour *et al.*, 2003). Las cepas silvestres de los ambientes contaminados con hidrocarburos aledaños a las zonas petroleras, por ejemplo en los departamentos de Piura y Loreto, han adaptado su metabolismo a este ambiente hostil con escasos nutrientes, sustrato carbonado insoluble, intercambio gaseoso reducido y estrés oxidativo. Estas condiciones promueven la producción de RL (Tabuchi, 2014).

Una sola cepa bacteriana produce diferentes tipos de RL. La cantidad, proporción y variedad de los diversos RL de la mezcla producida dependerá del metabolismo y genoma de la cepa en particular. También de las condiciones de cultivo y de la fuente de carbono utilizada (Tabuchi, 2014). Esto hace necesario caracterizar químicamente la solución purificada a partir de un medio de cultivo que estimule la producción de estos compuestos.

Principalmente las cepas superproductoras naturales de ramnolípidos pertenecen al género *Pseudomonas*. Estas han sido encontradas y aisladas de

ambientes que contienen gran cantidad de sustratos hidrófobos (Chrzanowski *et al.*, 2012; Willumsen y Karlson, 1997) por ejemplo: zonas contaminadas con crudo de petróleo o derivados (Tabuchi, 2014; Giraldo, 2012). Las primeras bacterias en reportarse la producción de RL pertenecen a la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Se han descrito algunos de los homólogos de RL producidos por esta especie como los mencionados por Abalos *et al.*, (2001) quienes identificaron una mezcla de siete homólogos de RL, teniendo como el de mayor abundancia (85%) a Rha-C₁₀-C₁₀ (Martínez, 2015).

Las bacterias de la especie *P. aeruginosa* son Gram-negativas pertenecientes a la clase γ -*Proteobacteria* según la secuenciación de rRNA 16s, y a la familia *Pseudomonadaceae*. Son de forma bacilar, quimioorganotrófica, aeróbicas, con un flagelo unipolar (motilidad), no formadoras de esporas, capacidad denitrificante, oxidasa positiva, catalasa positiva y lipasa positiva. Además de lo mencionado secretan una variedad de pigmentos característicos: piocianina (verde-azul), pioverdina (verde-amarillo fluorescente), piorubina (rojo-marrón) y fluoresceína (verde fluorescente) (Sánchez, 2010; Tabuchi, 2014).

Ecológicamente son bacterias muy importantes, encontrándose en suelo y agua. Son potencialmente patogénicas de plantas y animales; consideradas también como patógenos oportunistas y causantes de infecciones nosocomiales. Son muy resistentes a la mayoría de antibióticos especialmente las cepas mucoides que forman biopelículas. Presentan factores de virulencia como exotoxina A y exotoxina S, elastasa B, elastasa A, proteasa alcalina y dos hemolisinas, una termosensible o fosfolipasa C y otra termoestable o ramnolípido (Sánchez, 2010).

Las bacterias del grupo *P. aeruginosa* son capaces de crecer en diesel y gasolina, por lo que se le categoriza como un HUM (“hydrocarbon-using microorganism”). A pesar de ser clasificadas como organismos aeróbicos, son considerados por muchos investigadores como anaeróbicos facultativos, ya que están

bien adaptados para proliferar en condiciones de escasez parcial o total de oxígeno (Tabuchi, 2014).

Para la producción de ramnolípidos con estas bacterias a escala de laboratorio se han usado medios mínimos minerales suplementados con una sola fuente de carbono, puesto que estos brindan las mejores condiciones para la producción del biosurfactante a diferencia de los medios ricos en nutrientes (Martínez y Osorio, 2007).

2.5.1 *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11

La cepa *P. aeruginosa* 6K-11 forma parte del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la UNMSM. Esta cepa fue aislada de una zona contaminada con hidrocarburos en la provincia de Talara (Piura, Perú). Tabuchi (2014), determinó que esta cepa es una de las 3 mejores productoras de ramnolípidos usando el *screening* de revelado de agar CTAB/MB.

2.6 Técnicas para el análisis de ramnolípidos

En las investigaciones relacionadas con los RL, una gran variedad de métodos de análisis se han empleado para identificarlos y cuantificarlos. Estos métodos van desde una medición colorimétrica sencilla de la fracción de ramnosa, después de una previa hidrólisis de los ramnolípidos (Chandrasekaran, *et al.*, 1980), hasta un sofisticado análisis de composición de la muestra mediante espectrometría de masas (Déziel, *et al.*, 1999; Déziel, *et al.*, 2000). Las reacciones colorimétricas que se realizan generalmente se dan mediante la unión de un colorante con el ramnolípidos o por reacción de la ramnosa con un compuesto químico (por ejemplo un derivado de fenol: prueba de la antrona, del orcinol o del resorcinol) que se pueda cuantificar por fotometría. Otras técnicas indirectas también son la prueba de la tensión superficial, la actividad hemolítica y la prueba del agar CTAB/MB (Heyd, *et al.*, 2008).

2.6.1 Prueba de revelado de ramnolípidos en Agar CTAB/MB con HCl

La técnica del agar CTAB/MB fue desarrollada para detectar bacterias productoras de RL. Esta técnica es bastante simple y efectiva (Siegmund y Wagner, 1991). Dicho *screening* permite visualizar un patrón de halos de color azul oscuro producto de la interacción entre los ramnolípidos, el CTAB y el azul de metileno (formación de halos de acomplejamiento: RL-CTAB-MB) alrededor de un inóculo o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (Tabuchi, 2014). Estas interacciones forman un par iónico insoluble entre los ramnolípidos aniónicos y el tensioactivo catiónico CTAB (Siegmund y Wagner, 1991; Gunther IV *et al.*, 2005).

Alrededor de 18 años después se reportó un patrón de 5 zonas características dentro de los halos de acomplejamiento usando un microscopio de disección y un transiluminador UV para optimizar la visualización de las zonas dentro de los halos de acomplejamiento (Pinzon y Ju, 2009). Recientemente la técnica ha sido mejorada a través de un revelado con ácido clorhídrico para la precipitación de los halos (formación de halos revelados: RL-CTAB-MB + HCl); esto permitió reportar un patrón de hasta 11 zonas (a diferentes condiciones) dentro de los halos revelados (Tabuchi *et al.*, 2015). En la figura 4 podemos observar un halo revelado de ramnolípidos y la esquematización del mismo separado en 10 zonas (H1, H2, H2.5₁, H2.5₂, H2.5₃, H3, H3.5, H4, H4.5 y H5).

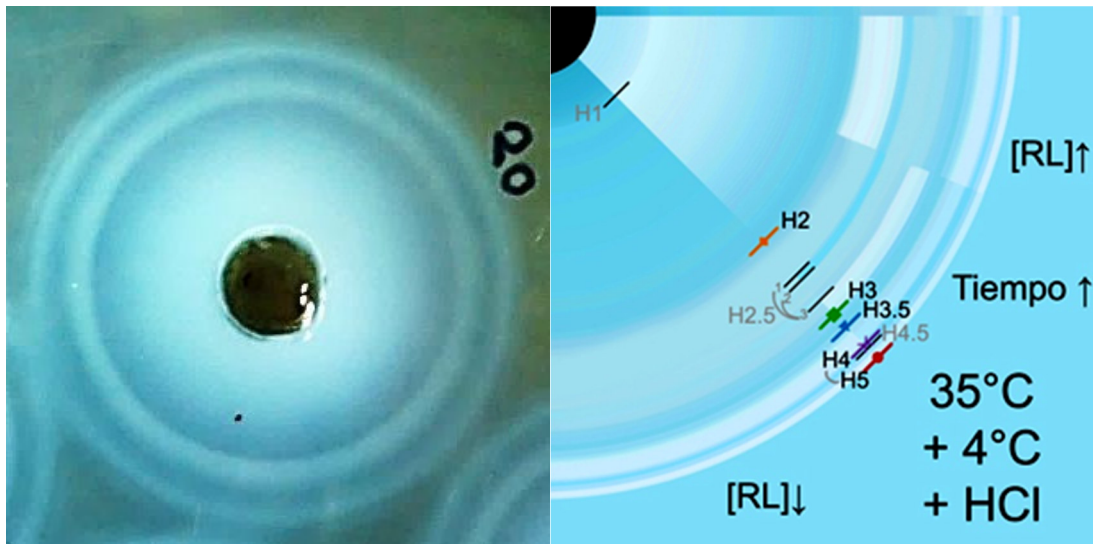


Figura 4. Halos revelados (izquierda). Detalle del esquema de un halo revelado a condiciones optimizadas (derecha).
Fuente: Tabuchi *et al.*, 2015.

No se tiene antecedentes del mecanismo exacto de la formación de estos halos ni de las diferencias químicas entre sus distintas zonas. Sin embargo, podemos afirmar que existen 2 tipos de zonas claramente distintas: las bandas (zonas blancas) y las separaciones (zonas translúcidas) y, que a diferentes condiciones se encontrarán variaciones en ellas (Tabuchi *et al.*, 2015). Tanto la cuantificación y como la cualificación de los ramnolípidos por esta técnica podrían estar influenciadas por variables de crecimiento celular de las bacterias, tiempos de cultivo, migraciones de los ramnolípidos y volúmenes de agar en las placas Petri (Heyd, *et al.*, 2008).

Quedó demostrado que el volumen de inóculo y la concentración de CTAB también influyen en el área total de estos halos (Tabuchi, *et al.*, 2015), pero no ha quedado claro cómo es que estos factores influyen en las zonas de separación entre cada banda. Por tal motivo parte de este trabajo consistió en evaluar la influencia de la concentración de agar, concentración de CTAB y volumen de inóculo para encontrar una separación adecuada entre las bandas de un patrón de halos revelados. La figura 5 esquematiza una posible extracción de bandas (B1, B2, B3 y B4) aprovechando las zonas de separación (S1, S2 y S3). También relaciona estas zonas con los límites caracterizados anteriormente (H1, H2, H3, H3.5, H4, H4.5, H5).

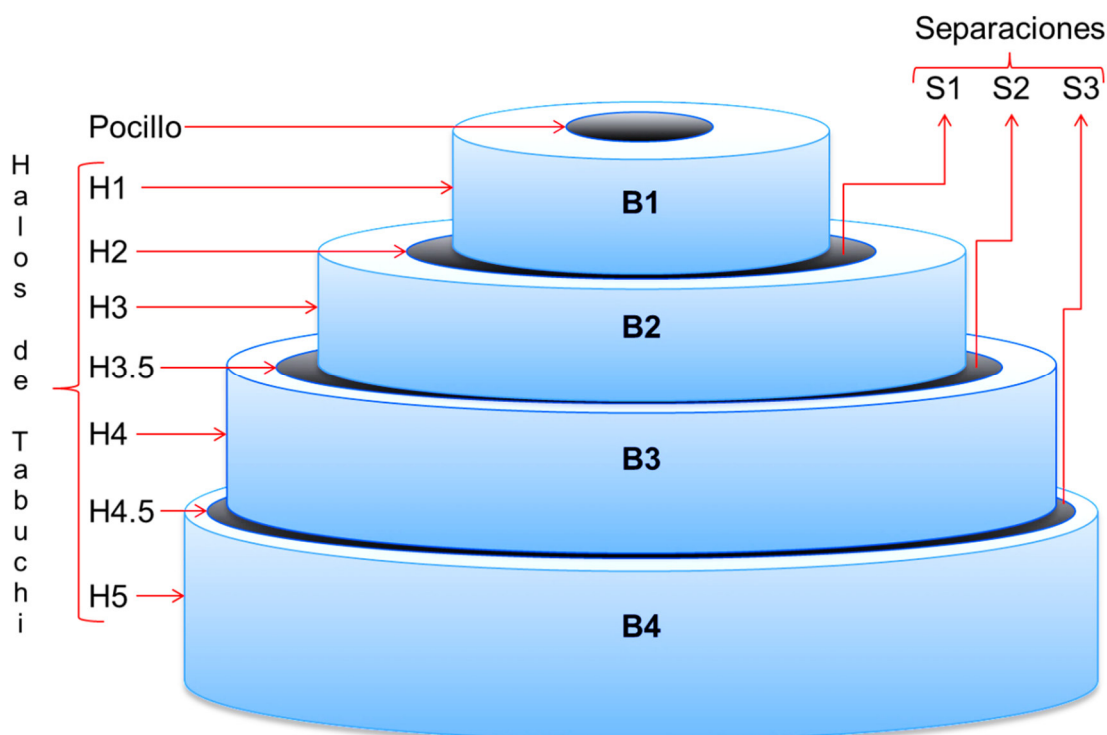


Figura 5. Esquemización de una posible extracción de bandas de RL de un patrón de halos revelados en agar CTAB/MB. Donde B es una banda; S, una zona de separación y H, un límite o frontera entre bandas, separaciones y el resto del agar.
Elaboración: Propia

A fin de conocer las propiedades de los tipos de RL producidos por una cepa bacteriana primero se debe determinar cuáles son los RL que producen nuestra cepa de interés. La técnica del agar CTAB/MB es una prueba rápida, simple y muy adecuada para la optimización del mismo medio y la detección de nuevas cepas productoras de biosurfactantes aniónicos (Perfumo *et al.*, 2006); su optimización para el revelado de los halos de ramnolípidos proporciona un patrón de repetitividad característico de cada cepa.

2.6.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Para una mejor comprensión de la relación entre las estructuras químicas de los ramnolípidos, la composición de sus mezclas y sus propiedades, es necesario el análisis estructural detallado. Esto se puede lograr mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) las cuales no solo son apropiadas para la separación de los RL (Schenk *et al.*, 1995; Arino *et al.*, 1996; Déziel *et al.*, 1999; Mata-Sandoval *et*

al., 1999; Ábalos, 2010) sino que también pueden ser acopladas con varios dispositivos de detección para su identificación y cuantificación. Los MS y los ELSD son algunos de los equipos más poderosos que existen para este fin (Heyd *et al.*, 2008).

También se puede utilizar para el análisis un detector de luz ultravioleta acoplado al HPLC (HPLC-UV); sin embargo, los ramnolípidos carecen de grupos cromóforos requeridos para la detección de UV en su estado nativo. Para superar este obstáculo, los RL deben transformarse (derivarse) a ésteres de p-bromofenacilo, que pueden ser detectados a 244 nm. A diferencia del análisis de HPLC-MS, en HPLC-UV y HPLC-ELSD se requieren de una comparación con tiempos de retención de estándares para permitir la identificación de la estructura (Smyth *et al.*, 2014). Por medio de HPLC-ELSD o HPLC-MS, los ramnolípidos pueden ser detectados sin derivación (Helbert y Brown, 1957; Arino *et al.*, 1996).

En general los análisis de LC-MS proporcionan un análisis en profundidad que combina la separación basada en la polaridad de la cromatografía líquida y la avanzada instrumentación de la espectrometría de masas (Smyth *et al.*, 2014). El MS es el detector más potente en cromatografía porque es capaz de detectar bajas concentraciones de analito, suministrando información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los compuestos que eluyen de una columna (fase estacionaria), y puede distinguir diferentes sustancias que tienen el mismo tiempo de retención. Actualmente la MS se utiliza para estudiar la secuencia de aminoácidos en proteínas, de ácidos nucleicos en ADN y las estructuras complejas de los hidratos de carbono (Arias, 2008), como los RL (Ábalos, 2010).

2.6.2.1 Tipos de Espectrómetros de masa

La espectrometría de masas se basa en la relación m/z . Esta relación se utiliza para denotar el cociente adimensional del número de masa atómica o molecular (m) de un ion por su número de carga (z). Así, por ejemplo, para el ion $(C_7H_7)^{2+}$, su m/z es igual a 45,5 (IUPAC, 2014). Las partículas con una determinada m/z siguen una específica trayectoria en el vacío cuando están sometidas a campos magnéticos o eléctricos (Steen y Mann, 2004).

En la MS se ionizan moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo a su m/z estableciendo parámetros para determinar su trayectoria y, finalmente, se detectan por medio de un dispositivo adecuado (Steen y Mann, 2004; Arias, 2008). Un MS consta de cuatro partes: sistema de introducción de muestras (puede ser directo, indirecto o a través de un cromatógrafo), fuente de ionización, analizador de masas y sistema detector y registrador (Arias, 2008).

Este equipo se introdujo al ámbito del análisis de biomoléculas al final de la década de los años 70 con la aparición de diversas técnicas de ionización “suave”, como la desorción por campo eléctrico, la desorción por plasma y la ionización por bombardeo con átomos rápidos. Estas técnicas permitían la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como los péptidos y las proteínas, sin producir la extensiva degradación característica de las denominadas técnicas de ionización “dura”, cuyo representante de referencia es el impacto electrónico. Posteriormente, en el inicio de los años 90, otros dos métodos de ionización suave, ESI y MALDI, desplazaron al bombardeo con átomos rápidos (Abián *et al.*, 2008).

La ionización de los RL se logra mediante ESI y MALDI ya que requieren de un método suave con poca fragmentación de moléculas primarias. Las moléculas ionizadas son seleccionadas por un analizador de masas de acuerdo con su m/z

(Smyth, *et al.*, 2014). Existen cuatro grandes grupos de analizadores de masas: analizadores de sectores (pueden ser magnéticos o electrónicos), de cuadrupolo, TOF y de confinamiento de iones [trampa iónica, "Orbitrap" y analizadores de resonancia ciclotrónica de iones (ICR)]. Los analizadores TOF provistos de reflectrón (reTOF), el Orbitrap y los sistemas actuales de ICR mediante transformada de Fourier (FT-ICR) superan ampliamente las características de los mejores sistemas de sector (Abián *et al.*, 2008).

Los cuadrupolos, hexapolos y octopulos son sistemas multipolares que están presentes en casi todos los tipos de MS modernos. Estos cumplen la función de filtros y guías de banda ancha de iones. Un cuadrupolo consiste en cuatro barras paralelas de 15 a 20 cm de largo y 0.5 cm de radio. Se encuentran en la misma dirección y están separadas entre sí por 2 cm. Se aplica un potencial combinado de corriente continua y de radiofrecuencia para crear en su interior un campo "cuadrupolar". Los iones generados en la fuente de ionización atraviesan longitudinalmente el espacio limitado por estas barras. Estos iones oscilan por el efecto del campo cuadrupolar y son desviados en función de su m/z , de forma que, para una determinada combinación de potenciales, sólo los iones de un estrecho rango de valores m/z llegan a incidir en el detector. Los demás iones (iones no resonantes) chocan con las barras y se pierden antes de llegar al detector (Abián *et al.*, 2008; Arias, 2008).

El analizador TOF se basa en los distintos tiempos en recorrer una misma distancia de acuerdo a las velocidades adquiridas de los iones acelerados por un campo magnético según su valor m/z (los iones de mayor m/z se desplazarán a lo largo del tubo de vuelo a menor velocidad y serán detectados después de los de menor m/z). El TOF separa y detecta en una escala de tiempo (tiempo de vuelo) todos los iones procedentes de la fuente de ionización, lo que permite una elevada sensibilidad. Por ello el sistema trabaja en régimen discontinuo por lo que es un

detector indicado para técnicas de ionización de carácter pulsante como el MALDI (Abián *et al.*, 2008; Arias, 2008).

El acoplamiento del TOF a fuentes de iones de producción continua como el ESI, se lleva a cabo por sistemas de confinamiento de iones intermedios que mediante campos eléctricos, acumulan e inyectan, perpendicularmente a la trayectoria inicial, paquetes de iones en el analizador en ciclos con frecuencia del orden de KiloHertz (Boyle y Whitehouse, 1992). El TOF es un analizador relativamente simple, barato, con un ciclo de barrido rápido y con un rango de masas, en teoría, ilimitado. Debe indicarse que este instrumento fue el primero en utilizarse en sistemas acoplados para cromatografía de gases-MS (GC/MS) (Abián *et al.*, 2008; Arias, 2008).

Los isómeros estructurales de ramnolípidos (por ejemplo Rha-C₁₀-C₈ y Rha-C₈-C₁₀) no pueden ser separados por los métodos simples de HPLC, pero sí se distinguen por tándem MS. Cuando se utiliza HPLC-MS/MS las sales y algunas otras impurezas pueden influir en la ionización del ramnolípido, durante la ionización en la fuente de iones del espectrómetro de masas y, por lo tanto, afectan a las intensidades de las señales medidas, por lo que las muestras deben ser previamente purificadas, (Heyd *et al.*, 2008).

La palabra tándem viene del inglés *tandem*, cuyo significado inicial es “conjunto de dos elementos que se complementan”. A diferencia de un equipo MS convencional un MS/MS está constituido de seis componentes agregándosele una cámara o celda de colisión y un segundo analizador de masas antes del detector (Fernández *et al.*, 2009). Existen diferentes acoplamientos entre los componentes de los equipos de MS/MS. La figura 6 representa un esquema general de ellos. Uno de los equipos más utilizados es el de tipo triple cuadrupolo, acoplado a una fuente de ionización por ESI.

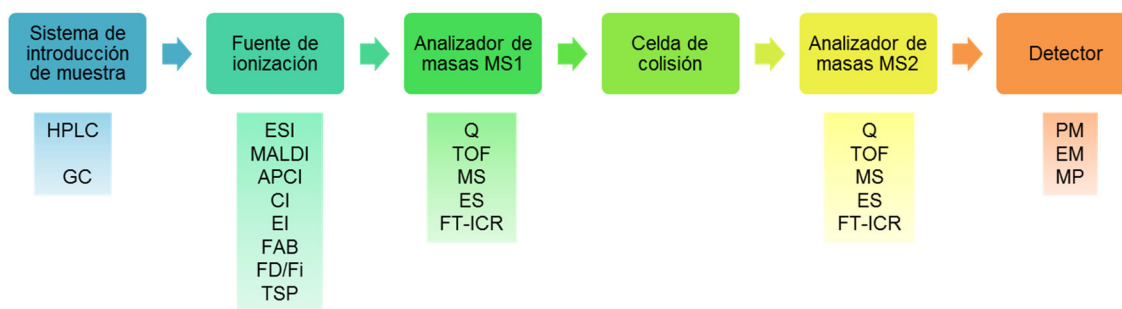


Figura 6. Esquema general de un sistema MS/MS con ejemplos de cada módulo en la parte inferior. Abreviaturas: **HPLC** High Performance Liquid Chromatography, **GC** Gas Chromatography, **ESI** Electrospray Ionisation, **MALDI** Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation; **APCI** Atmospheric Pressure Chemical Ionisation; **CI** Chemical Ionisation; **EI** Electron Impact; **FAB** Fast Atom Bombardment; **FD/FI** Field Desorption/Field Ionisation, **TSP** Thermospray Ionisation, **Q** Quadrupole, **TOF** Time of Flight, **MS** Magnetic sector, **ES** Electronic sector, **FT-ICR** Fourier transform, **PM** Photomultiplier, **EM** electron multiplier, **MP** Microchannel Plate.
Fuente: Fernández et al., 2009

Este equipo funciona de la siguiente manera: Una vez que la muestra ha sido introducida, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga; posteriormente pasa al MS1 en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo a su m/z. Los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un gas inerte; los fragmentos iónicos generados pasan por el MS2, los cuales se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el MS1. Los resultados generados se registran en forma de espectro de masas que es como la huella digital (“fingerprint”) de los compuestos analizados (Fernández et al., 2009).

2.6.2.2 UPLC-Q-TOF

El equipo UPLC ha sido desarrollado para permitir un mayor sistema de presiones que el convencional HPLC. Por ello emplea columnas con tamaños de partícula por debajo de 2 micras. Esto mejora la velocidad de la cromatografía, la resolución y la sensibilidad, además, reduce el tiempo de análisis de 30 a 2 minutos (Smyth et al., 2014).

El término Q-TOF es utilizado para describir un equipo MS/MS, en el cual un analizador cuadrupolo se utiliza en conjunto con el analizador tiempo de vuelo (TOF). El uso conjunto de estos analizadores ofrece una serie de ventajas que no pueden ser

obtenidas de forma independiente. En este sistema el cuadrupolo se utiliza para seleccionar y guiar los iones examinados, el hexapolo (celda de colisión) para producir fragmentos iónicos y el analizador tiempo de vuelo para la detección simultánea de los iones a lo largo de todo el rango de masas (Arias, 2008). La figura 7 detalla un esquema de este equipo.

El análisis de espectrometría de masas utilizando un instrumento Q-TOF proporciona información precisa sobre las estructuras de los glicolípidos en la medición de masas moleculares a cuatro decimales. Los datos obtenidos utilizando este instrumento (en el modo MS/MS), permite la identificación de la mayoría de estas moléculas. Combinado con UPLC, el cual ofrece una resolución de cromatografía líquida superior, puede identificar y discriminar isómeros de glicolípidos con rendimientos muy altos (Smyth *et al*, 2014).

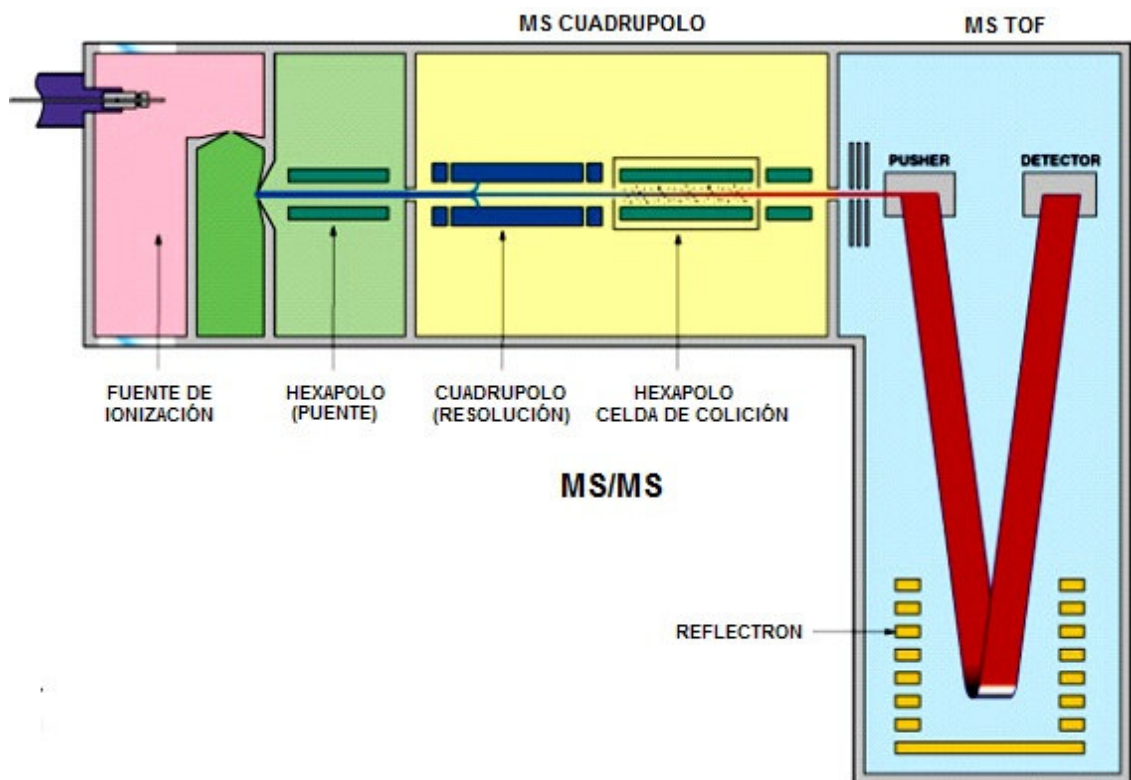


Figura 7. Diagrama esquemático del instrumento ortogonal Q-TOF. Combina un analizador de masas de tipo cuadrupolo (MS1), una celda de colisión hexapolar y un analizador de masas TOF (MS2) para ofrecer un alto rendimiento de MS/MS. Fuente: Arias, 2008.

2.6.2.3 Interpretación de resultados

En un equipo de LC-MS se obtienen dos tipos de resultados: los cromatogramas y los espectros de masas. Los cromatogramas pueden informar el número de compuestos químicos que se pueden separar de una mezcla (según la cantidad de picos en el cromatograma), pero no proporcionan información sobre su naturaleza química. En el eje X de un cromatograma se cuantifica el tiempo; en el eje Y, la abundancia relativa (según la señal del detector). El t_R es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el soluto alcanza al detector. Si existen especies químicas que no fueron retenidas en la columna, entonces estas alcanzarán al detector con un tiempo mucho menor al t_R . A este tiempo se le denomina tiempo muerto. El ancho de la base de cada pico depende del tiempo transcurrido desde que el soluto alcanza el detector hasta que lo abandona.

Las técnicas de análisis cromatográfico ofrecen escasas posibilidades para hacer análisis cualitativos, sin embargo las posibilidades de llevar a cabo técnicas cuantitativas son enormes. La medida del área o de la altura del pico cromatográfico, es el factor más importante. Existen muchos métodos que permiten medir las áreas bajo los picos cromatográficos, aunque la medida por medio de integración electrónica es la técnica más utilizada. El dispositivo digitaliza la señal analógica proporcionada por el detector, detecta el comienzo y el final de cada pico cromatográfico, integra digitalmente el área bajo la curva y corrige automáticamente la línea de base (Arias, 2008; Fernández *et al.*, 2009; Smyth *et al.*, 2014).

Cada plano digital de un pico en el cromatograma está representado por la corriente de iones que eluyen, por la columna, en un determinado tiempo. De esta manera se obtienen varios espectros de masas a diferentes t_R (Steen y Mann, 2004). La figura 8 muestra la relación entre los cromatogramas y los espectros de masas.

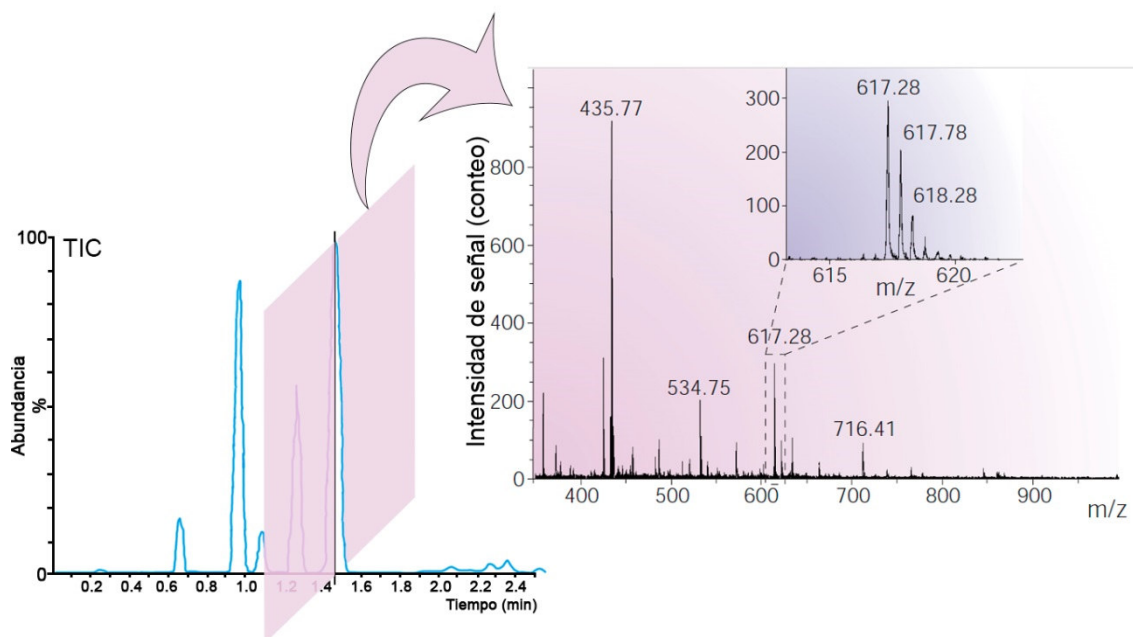


Figura 8. Obtención digital de un espectro de masas. La corriente de iones totales (TIC) o de un ion en particular (extracción), que eluye en un determinado tiempo, se puede detectar mediante espectrometría de masas.

Fuente: Steen y Mann, 2004

Elaboración: propia

A diferencia de un cromatograma, en un espectro de masas sí se puede identificar la estructura química de las moléculas. Un espectro de masas representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la m/z de cada uno de estos y, está dada por las reacciones químicas que experimentan las moléculas de la muestra en estado excitado (Castro, 2007).

Para la interpretación de un espectro de masa se requiere del conocimiento de las reacciones que pueden originarse en el espectrómetro, así como de los iones que estas reacciones pueden generar: Las moléculas que sólo adquirieron carga sin ser fragmentadas se conocen como iones moleculares, iones pseudomoleculares o iones padre; las moléculas que, además de ionizarse, se fragmentan se conocen como productos iónicos, fragmentos iónicos o iones hijos (de la expresión en inglés “daughter ion”) (Castro, 2007; Fernández *et al.*, 2009).

En MS/MS se podrá detectar picos muy compactados, que en rangos superiores a 300 unidades de m/z serán representados en forma de barras (como se muestra en la figura 8). Estos picos corresponden a los dos tipos de iones

(moleculares y fragmentos) (Ábalos, 2010; Smyth *et al*, 2014; Rudden *et al*, 2015). La figura 9 muestra el espectro de masas de Rha-C₁₀-C₁₂ (532 Da) ionizado y fragmentado con Na⁺ (23 Da) por medio de MS/MS. Nótese que el cálculo teórico del ion molecular (m/z 555) depende de la carga del gas de colisión (532 Da + 23 Da, todo dividido entre 1). De la misma forma, para reconocer los fragmentos iónicos producidos por MS/MS se debe realizar el mismo cálculo.

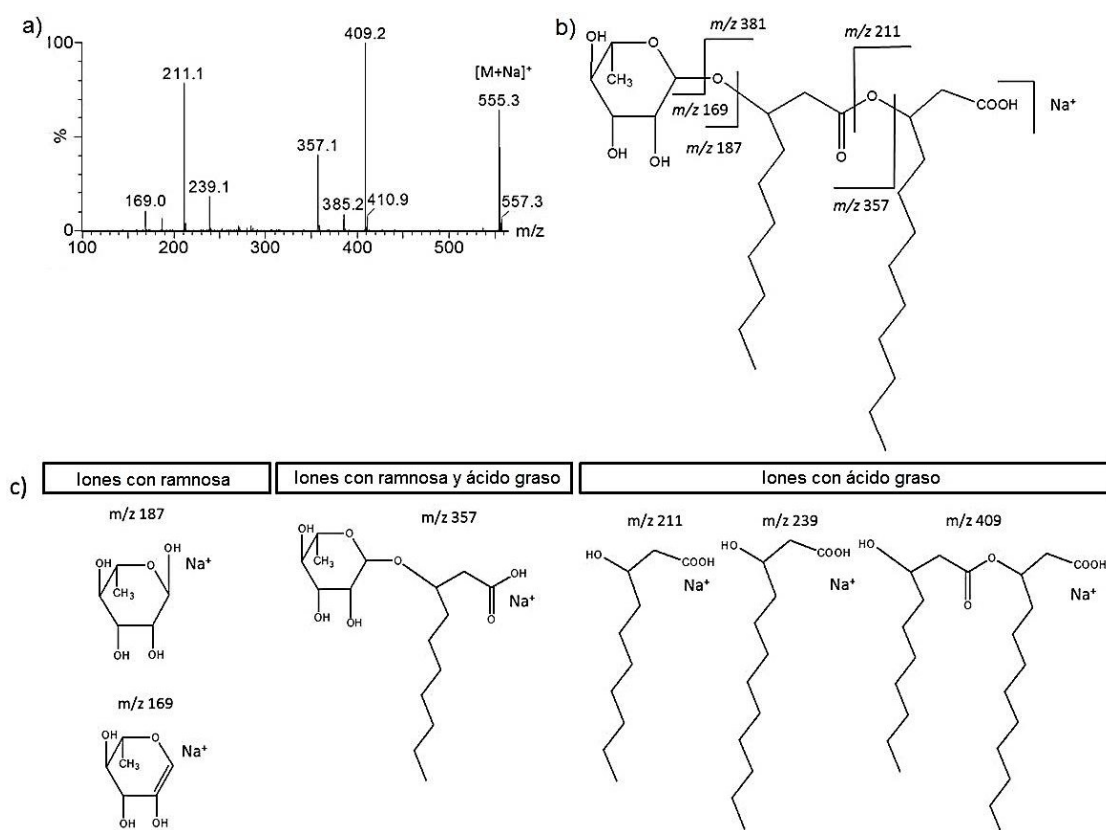


Figura 9. Interpretación de un espectro de masas. (a) Espectro de masas de Rha-C₁₀-C₁₂ (532 Da) producido por ESI-MS/MS en modo positivo. Muestra un ion molecular de [M+Na]⁺ con m/z de 555.3 y varios fragmentos iónicos obtenidos en ESI-QTOF. El fragmento de m/z 409.2 corresponde al pico base, al ser el de mayor intensidad. (b) Estructura molecular de Rha-C₁₀-C₁₂ con sus principales divisiones para la fragmentación según el espectro indicado. (c) Estructura molecular de los fragmentos iónicos originados.

Fuente: Pereira *et al.*, 2012.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis de investigación (Hi)

Existen diferencias en cuanto a composición química y abundancia de ramnolípidos en cada banda de un halo revelado con HCl en agar CTAB/MB de un inóculo ramnolipídico producido por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11.

3.1.2 Hipótesis nula (Ho)

No existen diferencias en cuanto a composición química y abundancia de ramnolípidos en cada banda de un halo revelado con HCl en agar CTAB/MB de un inóculo ramnolipídico producido por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

- Identificar los tipos de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 contenidos en las bandas de un halo revelado en agar CTAB/MB.

3.2.2 Objetivos específicos

- Optimizar una separación adecuada entre cada banda al evaluar la influencia de tres parámetros (concentración de agar, concentración de CTAB y volumen de inóculo) en la migración de los ramnolípidos.
- Purificar los ramnolípidos contenidos en las diferentes bandas de cada halo revelado en el agar CTAB/MB.
- Identificar los tipos de ramnolípidos purificados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Producción de ramnolípidos

Para la producción de ramnolípidos se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* 6K-11, la cual fue seleccionada como una de las tres mejores productoras de ramnolípidos pertenecientes al banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana (*Lamybim*) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Tabuchi, 2014).

Dicha cepa se reactivó en 5 mL de caldo peptona de caseína y soya (caldo CASO) y se incubó a 35°C por 24 horas para proceder con un escalamiento de inóculo al 10% del volumen final. Para la producción de los RL se utilizó el medio mínimo mineral propuesto por Abalos *et al.* (2001), Zhang *et al.* (2005) y Giraldo (2012): CaCl₂ 0.02 g/L, KCl 1 g/L, NaCl 1 g/L, K₂HPO₄ 4 g/L, KH₂PO₄ 4 g/L, Glicerol 3% v/v, NaNO₃ 2.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L y solución de elementos traza 2mL/L (H₃BO₃ 0.26 g/L, Na₂MoO₄ 0.6 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.5 g/L, MnSO₄ 0.5 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.7 g/L) El medio se ajustó a un pH de 6.8. Finalmente se incubó a 35°C y 140 RPM durante 10 días (Tabuchi, 2014; Martínez, 2015).

4.2 Purificación de ramnolípidos a partir de extracto crudo

Luego del periodo de incubación se realizó la técnica empleada por Wang *et al.* (2007) que fue modificada por Giraldo (2012). El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos para eliminar la biomasa existente. El sobrenadante obtenido fue acidificado hasta alcanzar un pH de 2.0 con la adición de HCl al 18.5% y se mantuvo a 4°C durante toda una noche. Los RL que precipitaron fueron recuperados por centrifugación a 5000 rpm durante 1 hora y fueron disueltos en agua destilada. Se añadió una mezcla de cloroformo y etanol en proporción de 2:1 y se agitó durante 30 minutos. La fase orgánica obtenida fue recolectada y puesta inmediatamente a evaporar obteniéndose finalmente un total de 1.6 g de mezcla de RL (RL 6K-11).

4.3 Optimización de áreas de separación entre bandas

Para optimizar las áreas de separación se empleó una metodología de superficie de respuesta. Las metodologías de superficie de respuesta son un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. Con el objetivo de optimizar dicha variable se determinan las condiciones óptimas de operación del sistema. Existen varios diseños experimentales para ajustar superficies de respuesta: diseños factoriales 2^k , fracciones de serie 2^k , diseños simplex, diseños Plackett-Burman, diseño central compuesto, diseño equirradial y el diseño de Box-Behnken (Cornell, 1990; Montgomery, 1991).

A diferencia de otros diseños experimentales el diseño de Box-Behnken permite reducir el número de experimentos necesarios para la optimización de un proceso al combinar el diseño factorial 2^k con un diseño de bloques incompletos. Este diseño toma 3 niveles en un número determinado de factores (mínimos, centrales y máximos) y combinan algunos de estos niveles entre sí para ajustar modelos de primer y segundo orden (Montgomery, 1991; Jaramillo *et al.*, 2013). La distribución de los experimentos suele ser aleatoria, sin embargo, siempre se repite el punto central (combinación de niveles centrales) más de una vez para otorgarle mayor robustez al diseño, es decir que al reproducir la respuesta central más veces se puede dar un mejor ajuste al modelo matemático.

En la tabla 4 se describen los 3 factores evaluados (concentración de CTAB, concentración de agar y volumen de inóculo) y sus correspondientes niveles seleccionados para optimizar el área de separación entre bandas de halos revelados.

Tabla 4. Niveles máximos, mínimos y centrales de los factores

Factor	Unidades	Mínimo	Central	Máximo
Agar	g/L	11	17	23
CTAB	g/L	0.1	0.2	0.3
Inóculo	μ L	20	30	40

Las variables de respuesta fueron las áreas de separación que existen entre las diferentes bandas. La elaboración y análisis del diseño experimental fueron realizados con el software Design-Expert 9 versión 9.0.6.2. Licencia, edición de evaluación gratuita. En la tabla 5 se detallan las combinaciones del diseño elaborado. En total se realizaron 17 experimentos con 5 puntos centrales. La figura 10 representa la distribución de las combinaciones en el espacio según los niveles de cada factor.

Tabla 5. Diseño experimental Box-Behnken para optimizar el área de separación entre bandas de RL.

Orden de ejecución	Combinación	Agar (g/L)	CTAB (g/L)	Inóculo (μL)
1	C1	11	0.1	30
2	C2	11	0.2	20
3	C3	11	0.3	30
4	C4	11	0.2	40
5	C5	17	0.2	30
6	C5	17	0.2	30
7	C6	17	0.3	20
8	C7	17	0.1	40
9	C8	17	0.1	20
10	C5	17	0.2	30
11	C9	17	0.3	40
12	C10	23	0.3	30
13	C11	23	0.2	40
14	C5	17	0.2	30
15	C5	17	0.2	30
16	C12	23	0.1	30
17	C13	23	0.2	20

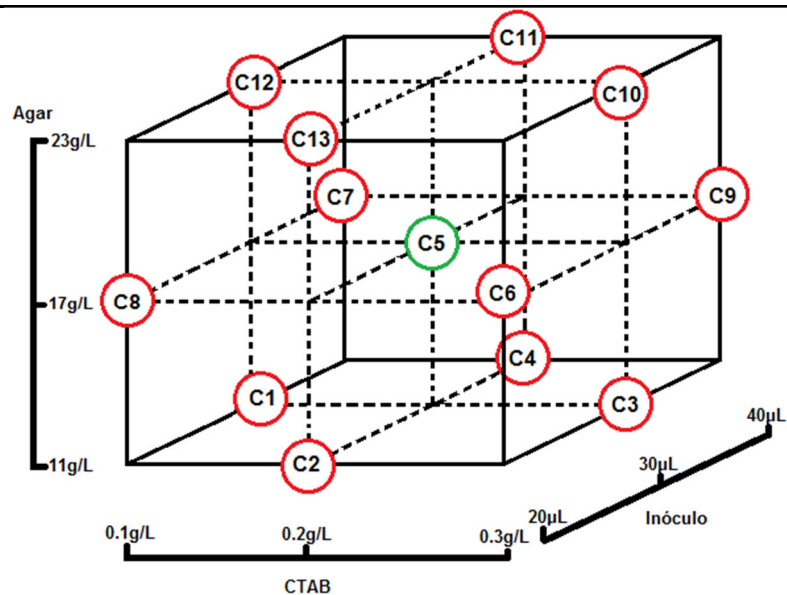


Figura 10. Distribución de experimentos según los niveles de cada factor. El círculo verde (C5) es el punto central el cual es el único que se repite.

Para el estudio se prepararon placas Petri con agar CTAB/MB según las recomendaciones de Tabuchi (2014): glicerol 20 g/L, KH_2PO_4 0.7 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9 g/L, NaNO_3 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, solución de elementos traza 2 mL/L y agar (11,17 y 23 g/L) suplementado con 0.005 g/L de azul de metileno (MB) y CTAB (0,1; 0,2 y 0,3 g/L). El agar CTAB/MB fue esterilizado en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 psi y, se dispensó 15 mL en cada una de las placas Petri con las mismas medidas (diámetro interno: ~90 mm), para lograr un espesor del agar de ~2 mm. Los agares fueron perforados en 3 zonas equidistantes para obtener pocillos de inoculación uniformes usando un sacabocados de 5.5 mm de diámetro.

En los pocillos se inocularon las soluciones de RL a concentraciones de 25 g/L en diferentes volúmenes: 20, 30 y 40 μL según el orden de ejecución de cada experimento. Las placas fueron incubadas a 35°C por 48 horas y luego fueron refrigeradas a 4°C por 24 horas adicionales (Gunther IV *et al.*, 2005). Posteriormente, los halos de las placas fueron revelados con HCl al 1N por 15 minutos (Tabuchi *et al.*, 2015) y el área de separación de las bandas fue medida mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ 1.49e (Rasband, 2013).

Los resultados fueron registrados en el software Design-Expert 9 para obtener modelos matemáticos de cada área de separación de los halos revelados. Para la elección de una respuesta adecuada se asignó un “parámetro óptimo” de los 4 que ofrece este software (“maximizar”, “minimizar”, “igual a” y “en el rango evaluado”) a cada factor y respuesta del modelo de cada banda, construyendo un índice de deseabilidad. El *di* nos da la probabilidad de obtener valores óptimos en la realidad. Este índice va desde 0 a 1. El valor de 1 representa el caso ideal y el valor de 0, que una o más respuestas caen fuera de los límites deseables.

La respuesta adecuada, que proporcionó el diseño, fue utilizada para iniciar la separación manual (extracción) y recuperación (re-purificación) de los ramnolípidos de cada banda de un patrón de halos revelados. Con estos resultados se prepararon 20

placas Petri con agar CTAB/MB y se hicieron 7 perforaciones en cada una para inocular, en todas, el volumen optimizado de RL.

4.4 Extracción y recuperación de los RL contenidos en las bandas

4.4.1 Extracción

Se extrajo cada banda desde el más externo hasta el más interno, siguiendo el esquema de la figura 5. Los trozos de bandas extraídas fueron depositados en recipientes de vidrio conteniendo agua destilada a pH neutro.

4.4.2 Recuperación

La técnica de recuperación de RL a partir de agar CTAB/MB empleada se fundamentó en tres propiedades fisicoquímicas: La temperatura máxima que soportan los RL (~100 °C), la capacidad de formar complejos iónicos reversibles con el CTAB y su precipitación a pH ácido. Las muestras contenían principalmente: sales, glicerol, agua destilada y complejo RL-CTAB-MB+HCl dentro de agar en estado sólido.

Se realizaron las modificaciones necesarias a la técnica de precipitación ácida convencional (descrita por Wang *et al.*, 2007 y Giraldo 2012): los recipientes fueron calentados en baño maría hasta licuar el agar (T° Fusión = 70°C aprox.), luego se añadió 10 mL de solución NaCl a 0.1 g/mL y se agitó por 30 minutos, se agregó la mezcla de etanol:cloroformo (1:2, p/v) y se volvió agitar por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 5000 RPM por 15 minutos. Recuperándose la fase orgánica y extrayendo el cloroformo por evaporación. Por último se adicionó agua destilada a pH neutro hasta liberar todo el MB residual. Se solubilizó el RL en agua destilada pH = 9 y se repitió el proceso para asegurar la máxima purificación de cada muestra.

4.5 Análisis instrumental UPLC-MS/MS

Para la identificación de los RL contenidos en cada banda extraída se hizo empleo de un Cromatógrafo líquido de ultra eficiencia (UPLC) (Waters ACQUITY®) acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar con tiempo de vuelo (MS Xevo G2-XS QToF) del Laboratorio de Investigación Multidisciplinaria (LABINM) de la Universidad Privada Antenor Orrego (Trujillo). A continuación se detallan las condiciones del ensayo:

4.5.1 Separación cromatográfica

Las muestras se diluyeron a 0.1 mg/mL en metanol. La columna analítica (fase estacionaria) fue una Acquity UPLC BEH C18 (Milford, MA, EE.UU.) (1.7 μ m, 2.1x50 mm). Se trabajó a 40 °C, a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min y un volumen de inyección de 7.5 μ L. Las fases móviles usadas para el análisis fueron 0.1% ácido fórmico y 0.05 hidróxido de amonio (NH₄OH) como fase A y como fase B acetonitrilo. Se estableció la velocidad de flujo de 0.6 mL/min con las siguientes proporciones: de 0.0 a 3.5 min, 70% de A; de 3.5 a 3.6 min, 40% de A; de 3.6 a 4.0 min, 30% de A; de 4.0 a 4.2 min, 30% de A y de 4.2 a 4.7 min, 70% de A.

4.5.2 Espectrometría de masas

La identificación de los RL se realizó con un MS Q-TOF equipado con una fuente de ionización ESI. Se siguió el protocolo sugerido por Smyth *et al.* (2014) por el cual se establecieron los siguientes parámetros en el espectrómetro de masas: modo de ionización negativo, temperatura de la fuente 120 °C, temperatura de desolvatación 300 °C, flujo de gas de desolvatación 800 L/h y del cono de gas de desolvatación 50 L/h. El voltaje del capilar se estableció en 2.0 kV y el voltaje del cono en 30 V. Para determinar la presencia de isómeros se realizó la disociación inducida por colisión con argón por el aumento gradual de la energía de colisión de 25 a 35 eV. Por último se ajustó el rango de m/z entre 100 y 700 para detectar 14 tipos de RL predeterminados.

Para establecer los t_R se utilizaron dos patrones: RL estándar (RL comercial L510025 ALDRICH R-95M) y RL 6K-11 (muestra pura, sin inocular en agar CTAB/MB, de RL producido por *P. aeruginosa* 6K-11). Una vez establecidos los t_R en ambos patrones, según la cantidad de picos en los cromatogramas, se procedió a la búsqueda de los 14 RL en todas las muestras (primero en los dos patrones y luego en las bandas) identificando los iones moleculares y sus correspondientes fragmentos iónicos. La tabla 6 muestra a estos 14 RL como los más frecuentes en la producción de *P. aeruginosa* (Smyth *et al.*, 2014). Además aporta datos de los valores de m/z correspondientes a los iones moleculares y a los fragmentos iónicos más grandes formado por la ruptura del enlace éster (C-O) tal como se muestra en la imagen dentro de la misma tabla.

Tabla 6. Datos de iones moleculares desprotonados para los 14 ramnolípidos más frecuentes (producido por *P. aeruginosa*), junto con diagnósticos MS/MS de iones fragmentados correspondientes a la posición del enlace éster de ramno-di-lípidos.

Estructura Molecular	m/z		Fragmentación del enlace éster de R-di-L en MS/MS
	[M-H] ⁻	[M-H-C _m H _{2m+1} COOH] ⁻	
Rha-C ₈ -C ₁₀	475	305	<p style="text-align: center;">Mono-RL</p> <p style="text-align: center;">Di-RL</p> <p style="text-align: right;">m= 7-11 n=3-7</p>
Rha-C ₁₀ -C ₈	475	333	
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	503	333	
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	529	333	
Rha-C _{12:1} -C ₁₀	529	359	
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	531	333	
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	531	361	
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	621	451	
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	621	479	
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	649	479	
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	675	479	
Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	675	505	
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	677	479	
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	677	507	

Fuente: Smyth *et al.*, 2014.

Posteriormente, para cada RL, se aplicaron los filtros de Savitzky–Golay a las cantidades de señal de los iones moleculares y sus respectivos fragmentos iónicos. Este método permitió expresar las cantidades de señal en cantidades de área con las

que luego se realizaron un análisis comparativo de carácter semicuantitativo entre las abundancias relativas de las 14 moléculas detectadas.

Las abundancias relativas se calcularon basándose en el área del pico del ion molecular de cada congénere individual dividida por el área total de la suma de todos los niveles de referencia. Se siguieron las recomendaciones de Déziel *et al.* (1999) para los isómeros que no fueron resueltos por cromatografía, determinándose su abundancia relativa por las proporciones entre las áreas de los fragmentos iónicos detallados en la tabla 6, de acuerdo con la práctica actual de la literatura publicada en esta área (Rudden *et al.*, 2015, Ábalos, 2010). Para todos los procesos con espectro de masas se empleó el *software* MassLynx™ de Waters y para los cálculos de abundancia relativa, el software MS Office Excel 2010.

4.6 Análisis estadístico

Para la optimización de áreas de separación por la metodología de superficie de respuesta Box-Behnken se realizaron todos los experimentos por triplicado. Se tomaron las medias de cada combinación y se procesaron en conjunto. Se realizó la prueba de ANOVA, el cálculo de las desviaciones estándar y de los coeficientes de correlación que estuvieron sujetos a los resultados del diseño experimental. Se utilizaron los programas MS Office Excel 2010 y Design-Expert 9 versión 9.0.6.2.

V. RESULTADOS

5.1 Optimización de áreas de separación entre bandas

Se observó un patrón de bandas y separaciones como los que se describen en la tabla 7 y la figura 10. En total se observaron entre 7 y 9 halos según las combinaciones. Cabe resaltar que la cantidad máxima de áreas de separación encontradas fue de 4. En la figura 11 se puede observar que algunas combinaciones como la C7, solo tienen 3 separaciones.

Tabla 7. Descripción de Bandas (B) y separaciones (S) en los halos revelados de RL 6K-11.

Código	Descripción
B1	Banda delgada, opaca y de color blanco
S1	Separación de tamaño variable y translúcida
B2	Banda gruesa, opaca y de color blanco
S2	Separación delgada y translúcida
B3	Banda delgada, opaca y de color blanco
S3	Separación gruesa o delgada y translúcida
B4	Banda gruesa, opaca y difusa (en algunas zonas pierde intensidad).
S4	Separación delgada y difusa (difícil de distinguir)
B5	Banda de tamaño variable y opaca (difusa en algunas zonas)

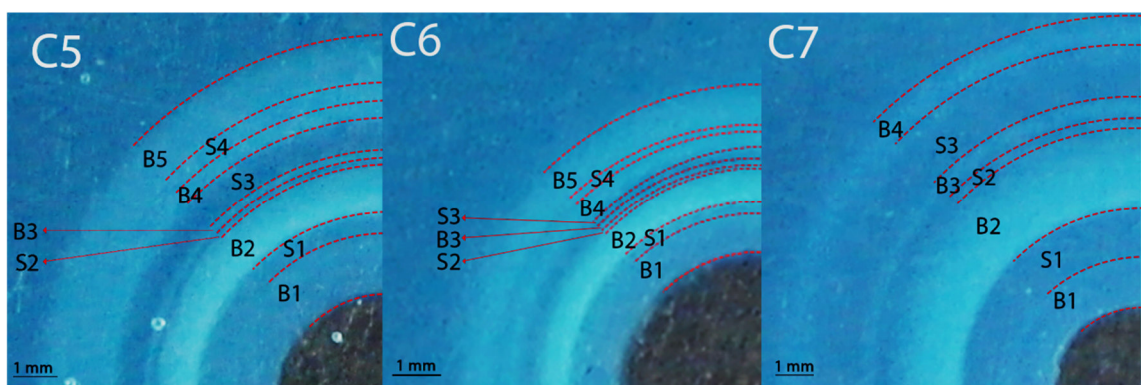


Figura 11. Patrón de halos revelados del RL 6K-11 en tres combinaciones (C5, C6 y C7).

En la tabla 8 se registran las bandas y separaciones encontradas en las 13 combinaciones evaluadas. El número 1 (uno) indica presencia y el 0 (cero), ausencia. Se puede apreciar que en las combinaciones C1, C7, C8, C11 y C12 no se registró la presencia de la separación S4 ni tampoco de la banda B5.

Tabla 8. Cantidad de Halos según Bandas (B) y Separaciones (S) de cada combinación (C).

Código	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S4	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
B5	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
Cantidad de Halos	7	9	9	9	9	9	7	7	9	9	7	7	9

Se utilizó el diseño para aplicarlo a 4 funciones de respuesta (correspondientes a las 4 áreas de separación) de tal manera que se tomen como un sistema en conjunto y, de este modo, obtener un solo resultado de optimización que responda a dichas áreas. La tabla 9 registra los resultados de cada combinación. Los datos se presentan según el orden de ejecución.

Tabla 9. Áreas de separación de las bandas de RL6K-11 para cada combinación del diseño Box-Behnken

Combinación	Área S1 (cm ²)	Área S2 (cm ²)	Área S3 (cm ²)	Área S4 (cm ²)
C1	0.284607	0.138224	0.463247	0
C2	0.039643	0.033543	0.127800	0.076635
C3	0.061385	0.023396	0.088151	0.116276
C4	0.255505	0.098753	0.405326	0.201994
C5	0.122642	0.055051	0.242557	0.184162
C5	0.093378	0.062176	0.202010	0.238621
C6	0.042680	0.021932	0.081246	0.098587
C7	0.368579	0.155917	0.797298	0
C8	0.103194	0.050481	0.343196	0
C5	0.108010	0.058614	0.222283	0.211392
C9	0.088823	0.039920	0.185971	0.154823
C10	0.000962	0.000520	0.001921	0.001291
C11	0.268484	0.164801	0.341431	0
C5	0.236152	0.072833	0.250217	0.194260
C5	0.178316	0.074178	0.170630	0.122251
C12	0.245504	0.148108	0.512117	0
C13	0.055297	0.043164	0.132131	0.075909

Con estos datos se modelaron matemáticamente 4 ecuaciones (uno para cada separación). La tabla 10 muestra los coeficientes estimados de los factores para cada uno de los modelos propuestos (para cada ecuación). La tabla 11 detalla los coeficientes de correlación y las desviaciones estándar. Además los resultados obtenidos fueron sometidos a la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de cada modelo, ello se indica en la tabla 12.

Tabla 10. Coeficientes estimados para las 4 funciones de respuesta: áreas de separación.

Factor	Coeficientes estimados*			
	Área S1	Área S2	Área S3	Área S4
	+0.150	+0.073	+0.220	+0.190
A: Agar	-8.862E-003	+7.835E-003	-0.012	-0.040
B: CTAB	-0.100	-0.051	-0.220	+0.046
C: Inóculo	+0.093	+0.039	+0.130	+0.013
AB	0	0	-0.034	-0.029
AC	0	0	-0.017	-0.050
BC	0	0	-0.087	+0.014
A ²	0	0	-0.026	-0.068
B ²	0	0	+0.075	-0.093
C ²	0	0	+0.060	-0.034

*Estos coeficientes son los coeficientes de las ecuaciones lineales (S1 y S2) y cuadráticas (S3 y S4) para modelar el comportamiento de separación de bandas de halos revelados.

Tabla 11. Coeficientes de correlación y desviación estándar para los modelos propuestos

Respuesta	Desv. Est.*	R ²
Área S1	0.050	0.8250
Área S2	0.024	0.8128
Área S3	0.056	0.9920
Área S4	0.039	0.9124

* Desv. Est., Desviación estándar

Tabla 12. ANOVA para la superficie de respuesta de los modelos matemáticos propuestos.

Respuesta	Fuente	Suma Cuad.	gl	Media	Valor F	Valor P*	
Área S1	Modelo	0.15	3	0.050	20.43	< 0.0001	
	<i>Modelo:</i>						
	<i>Lineal</i>	A: Agar	6.282E-004	1	6.282E-004	0.26	0.6218
		B: CTAB	0.082	1	0.082	33.17	< 0.0001
		C: Inóculo	0.069	1	0.069	27.86	0.0001
		Residuos	0.032	13	2.461E-003		
		Falta de ajuste	0.018	9	2.008E-003	0.58	0.7734
	Error puro	0.014	4	3.479E-003			
	Total	0.18	16				
Área S2	Modelo	0.033	3	0.011	18.82	< 0.0001	
	<i>Modelo:</i>						
	<i>Lineal</i>	A: Agar	4.911E-004	1	4.911E-004	0.83	0.3777
		B: CTAB	0.021	1	0.021	35.17	< 0.0001
		C: Inóculo	0.012	1	0.012	20.44	0.0006
		Residuos	7.652E-003	13	5.886E-004		
		Falta de ajuste	7.360E-003	9	8.178E-004	11.19	0.1165
	Error puro	2.924E-004	4	7.310E-005			
	Total	0.041	16				
Área S3	Modelo	0.60	9	0.067	95.94	< 0.0001	
	<i>Modelo:</i>						
	<i>Cuadrático</i>	A: Agar	1.174E-003	1	1.174E-003	1.68	0.2357
		B: CTAB	0.39	1	0.39	553.88	< 0.0001
		C: Inóculo	0.14	1	0.14	195.83	< 0.0001
		AB	4.563E-003	1	4.563E-003	6.54	0.0377
		AC	1.164E-003	1	1.164E-003	1.67	0.2376
		BC	0.031	1	0.031	43.72	0.0003
		A ²	2.785E-003	1	2.785E-003	3.99	0.0859
		B ²	0.023	1	0.023	33.52	0.0007
		C ²	0.015	1	0.015	21.61	0.0023
		Residuos	4.886E-003	7	6.979E-004		
		Falta de ajuste	7.277E-004	3	2.426E-004	0.23	0.8691
	Error puro	4.158E-003	4	1.039E-003			
	Total	0.61	16				
Área S4	Modelo	0.11	9	0.012	8.10	0.0058	
	<i>Modelo:</i>						
	<i>Cuadrático</i>	A: Agar	0.013	1	0.013	8.22	0.0241
		B: CTAB	0.017	1	0.017	11.21	0.0123
		C: Inóculo	1.396E-003	1	1.396E-003	0.91	0.3719
		AB	3.305E-003	1	3.305E-003	2.15	0.1856
		AC	0.010	1	0.010	6.60	0.0370
		BC	7.906E-004	1	7.906E-004	0.52	0.4961
		A ²	0.019	1	0.019	12.59	0.0094
		B ²	0.036	1	0.036	23.75	0.0018
		C ²	4.802E-003	1	4.802E-003	3.13	0.1202
		Residuos	0.011	7	1.534E-003		
		Falta de ajuste	3.275E-003	3	1.092E-003	0.58	0.6560
	Error puro	7.464E-003	4	1.866E-003			
	Total	0.12	16				

* Valores de p inferiores a 0,05 indican que el parámetro del modelo es significativo y valores mayores que 0,10 indican que no es significativo. Los 4 modelos son significativos.

Cada gráfico de superficie de respuesta obtenido arrojó un resultado óptimo independiente: cuando la concentración de agar se mantuvo constante a 17 g/L se obtuvieron áreas de separación de 0.35 cm², 0.16 cm², 0.8 cm² y 0.2 cm² para S1, S2, S3 y S4 respectivamente, lo cual se puede observar en las figuras del 12 al 15. De la misma forma, en las figuras del 16 al 198 se detallan las áreas 0.26 cm², 0.14 cm², 0.5 cm² y 0.15 cm² como valores óptimos de estas mismas separaciones, cuando se mantuvo constante el volumen de inóculo a 30 µL. Por último, en las figuras del 20 al 23 se pueden observar que las áreas óptimas fueron 0.13 cm², 0.25 cm², 0.4 cm² y 0.19 cm² cuando se mantuvo constante la concentración de CTAB a 0.2 g/L.

Los colores en las superficies representan los valores máximos, intermedios y mínimos según el siguiente orden: rojo (máximo), amarillo, verde, celeste y azul (mínimo). El valor del área de separación obtenido experimentalmente se muestra en un círculo de color rojo, si se encuentra encima de la superficie del modelo, y de color rosado, si se encuentra por debajo. El análisis completo exige que se optimicen todos los valores en conjunto.

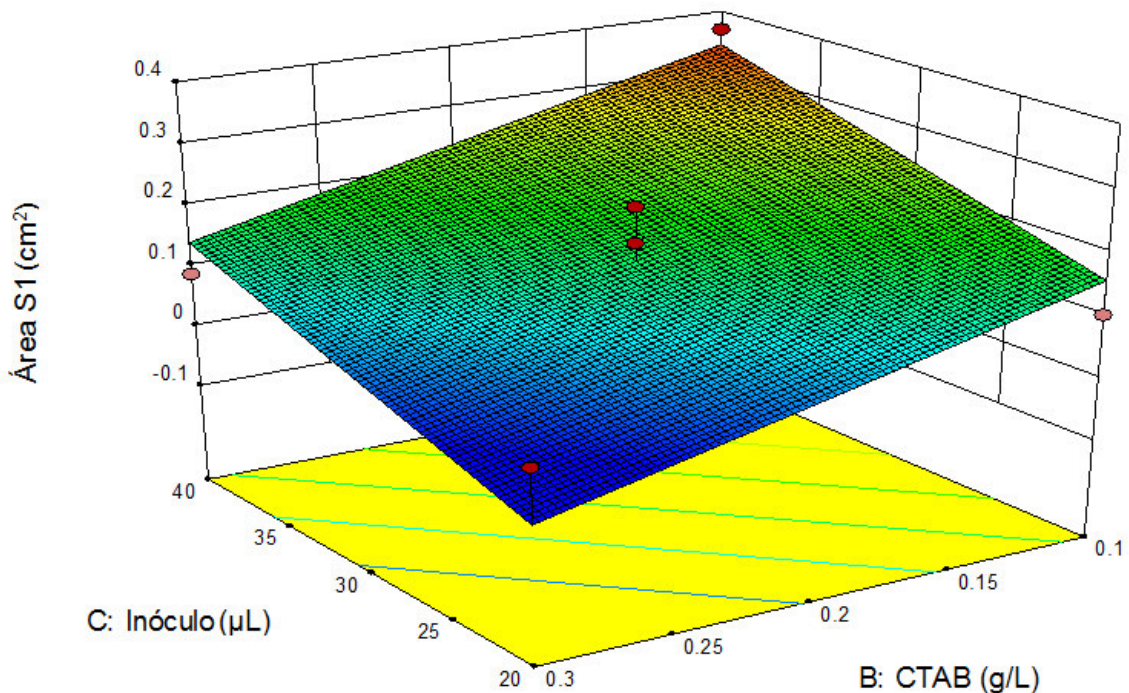


Figura 12. Superficie de respuesta del área S1 para una concentración de agar de 17 g/L.

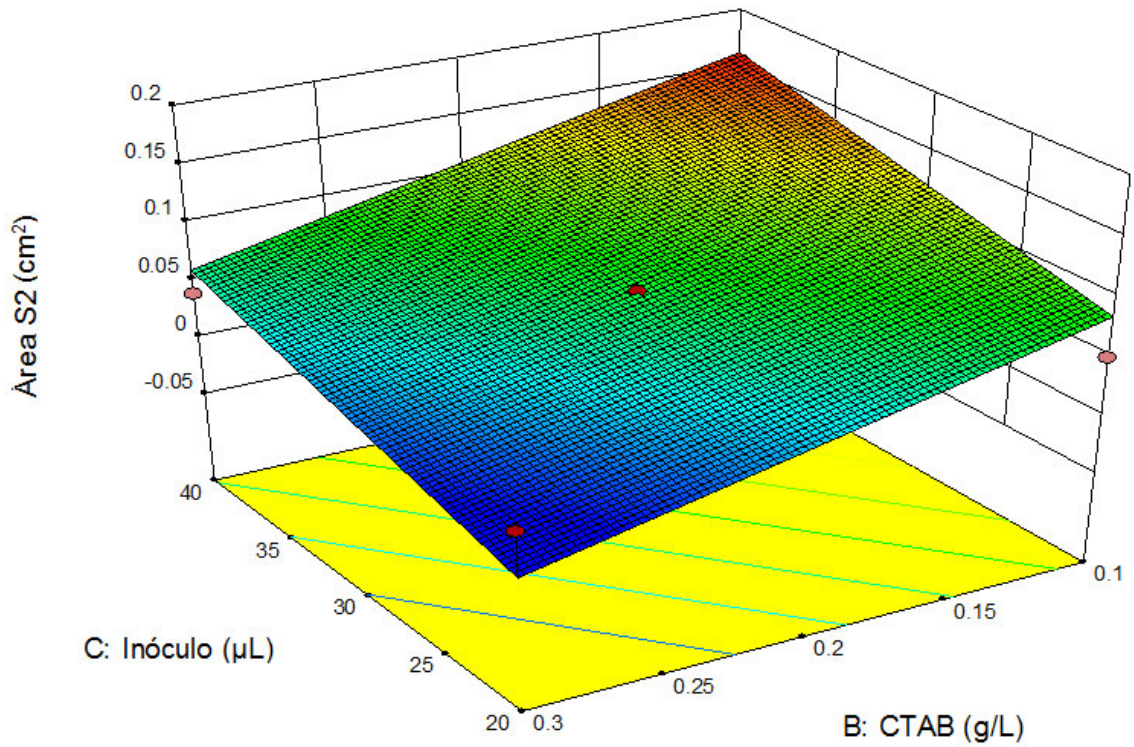


Figura 13. Superficie de respuesta del área S2 para una concentración de agar de 17 g/L.

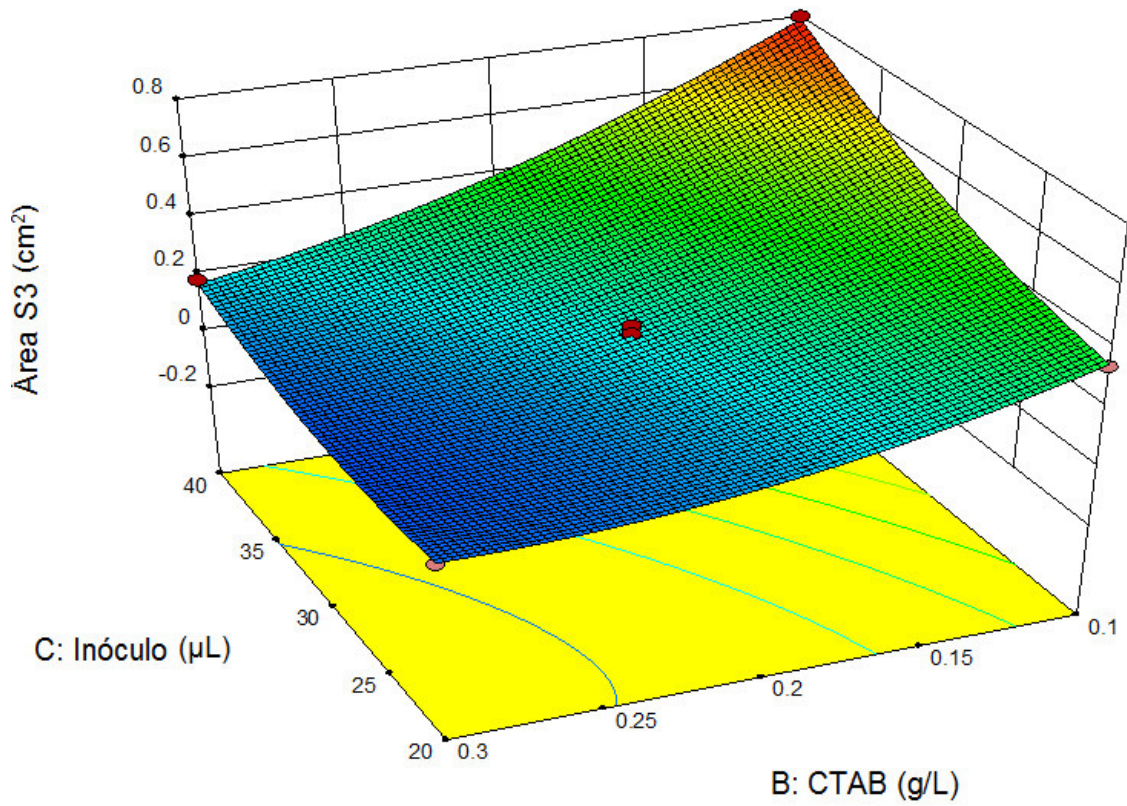


Figura 14. Superficie de respuesta del área S3 para una concentración de agar de 17 g/L.

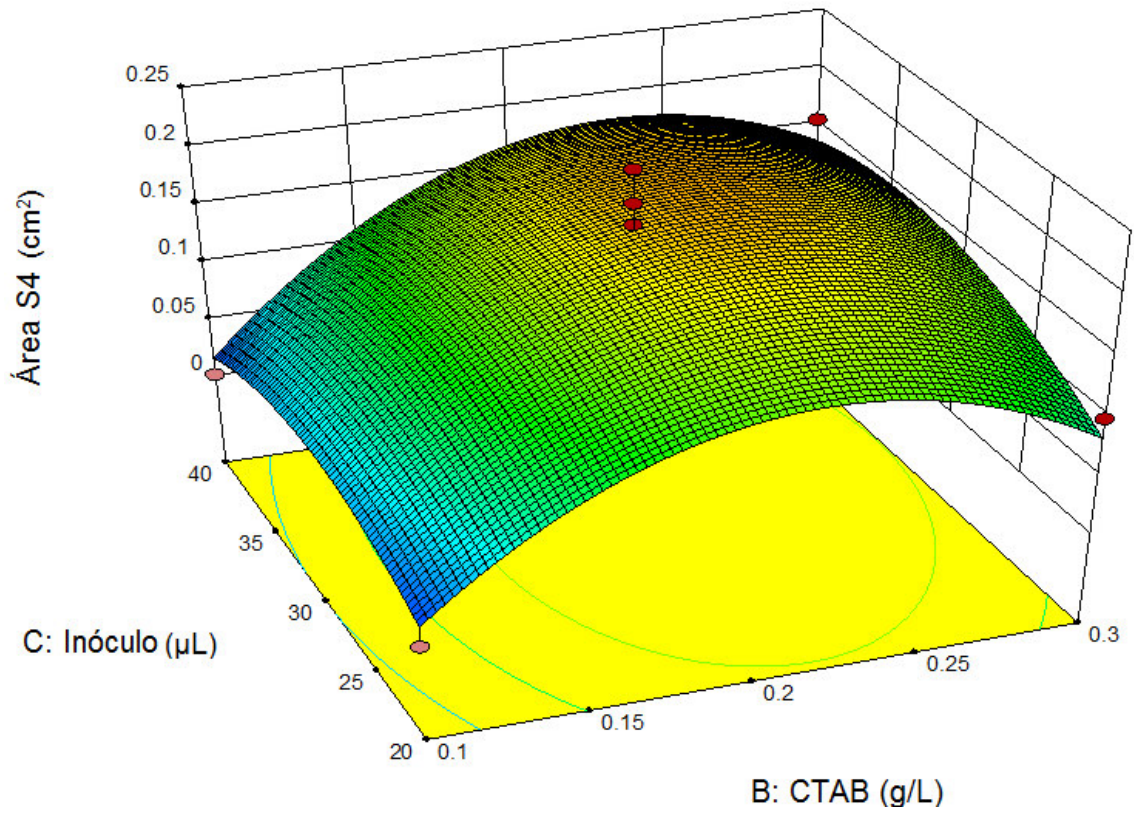


Figura 15. Superficie de respuesta del área S4 para una concentración de agar de 17 g/L

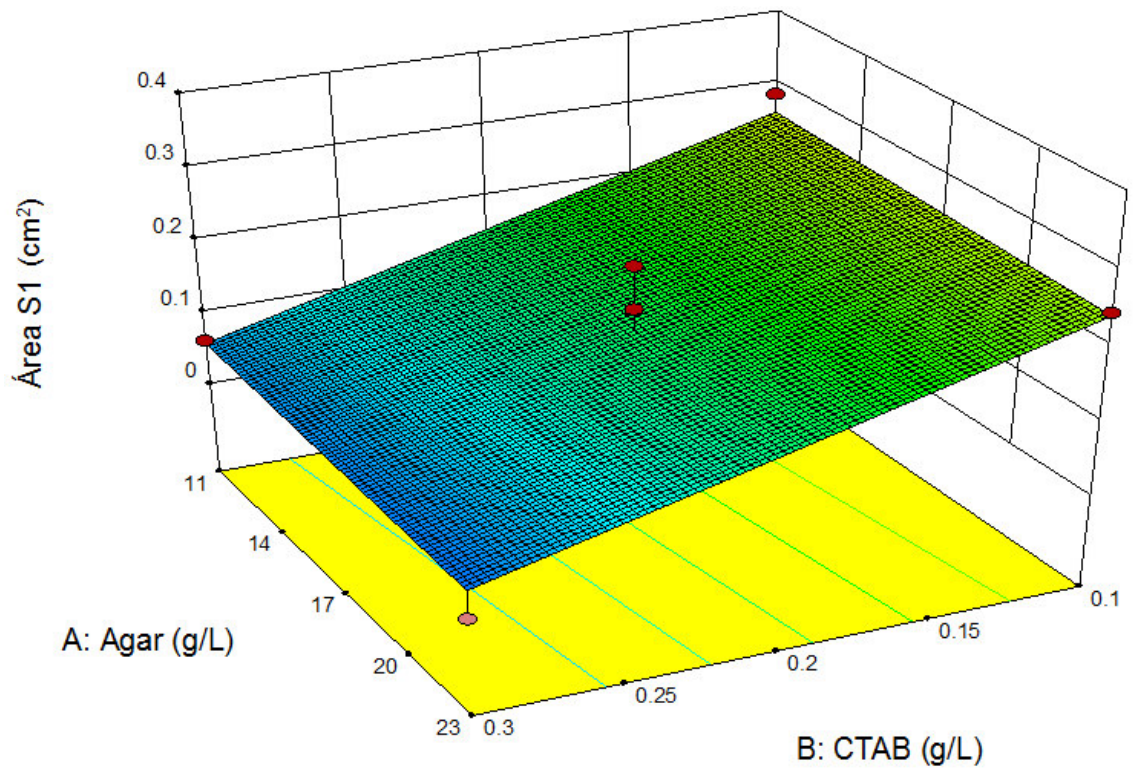


Figura 16. Superficie de respuesta del área S1 para un volumen de inóculo de 30 µL.

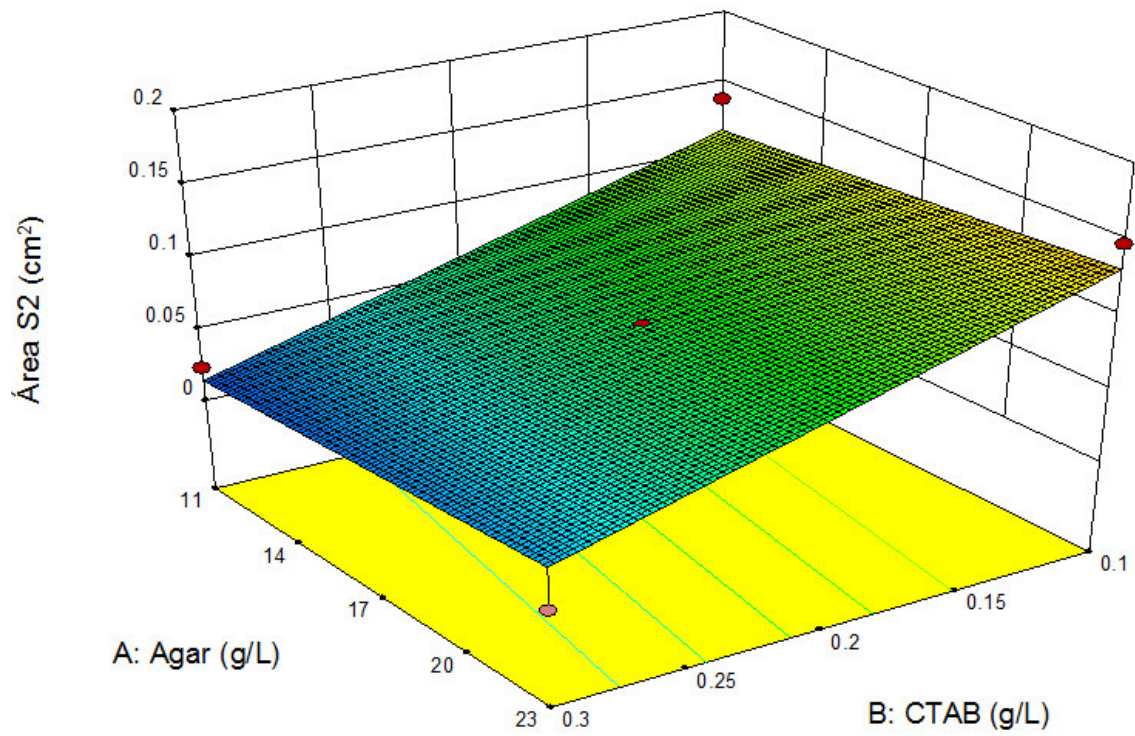


Figura 17. Superficie de respuesta del área S2 para un volumen de inóculo de 30 μL .

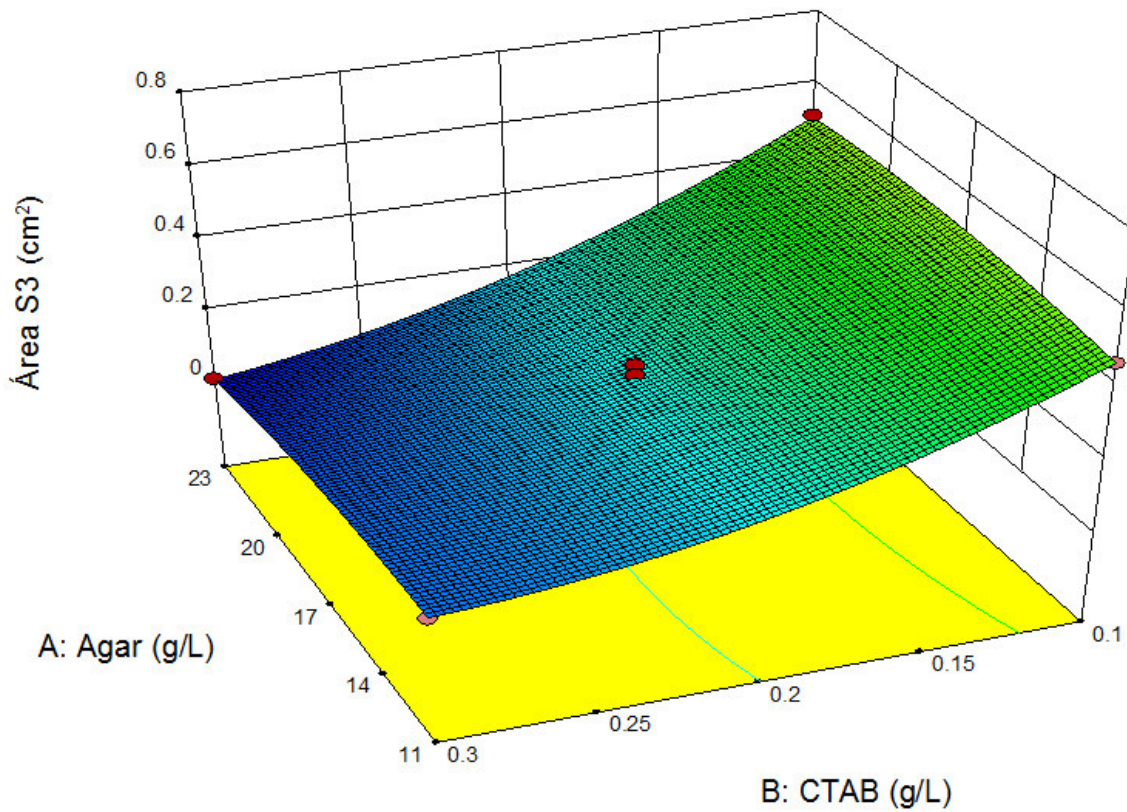


Figura 18. Superficie de respuesta del área S3 para un volumen de inóculo de 30 μL .

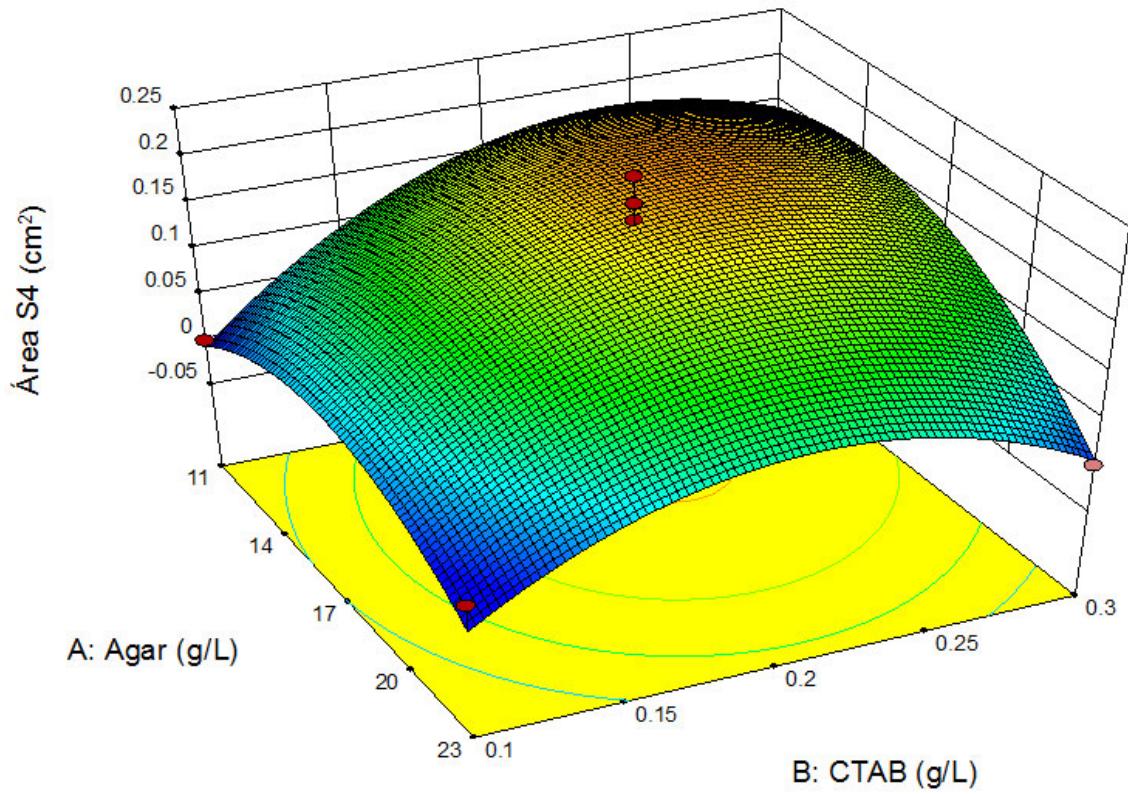


Figura 19. Superficie de respuesta del área S4 para un volumen de inóculo de 30 μL .

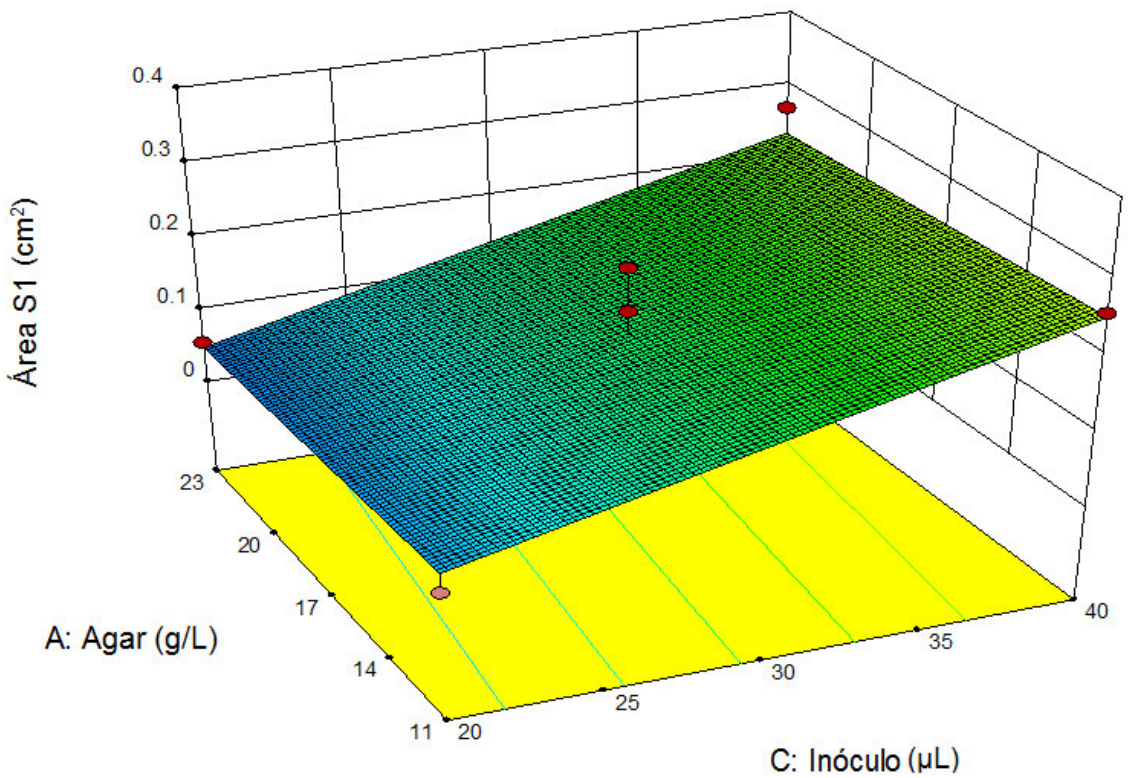


Figura 20. Superficie de respuesta del área S1 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L.

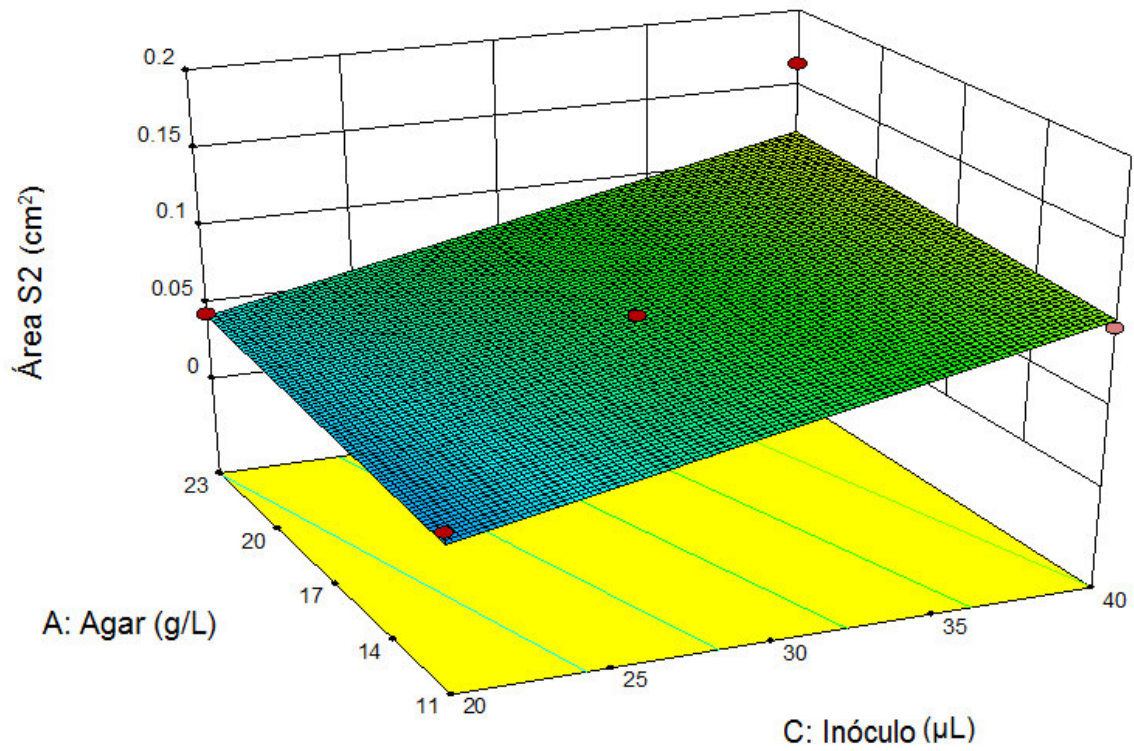


Figura 21. Superficie de respuesta del área S2 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L.

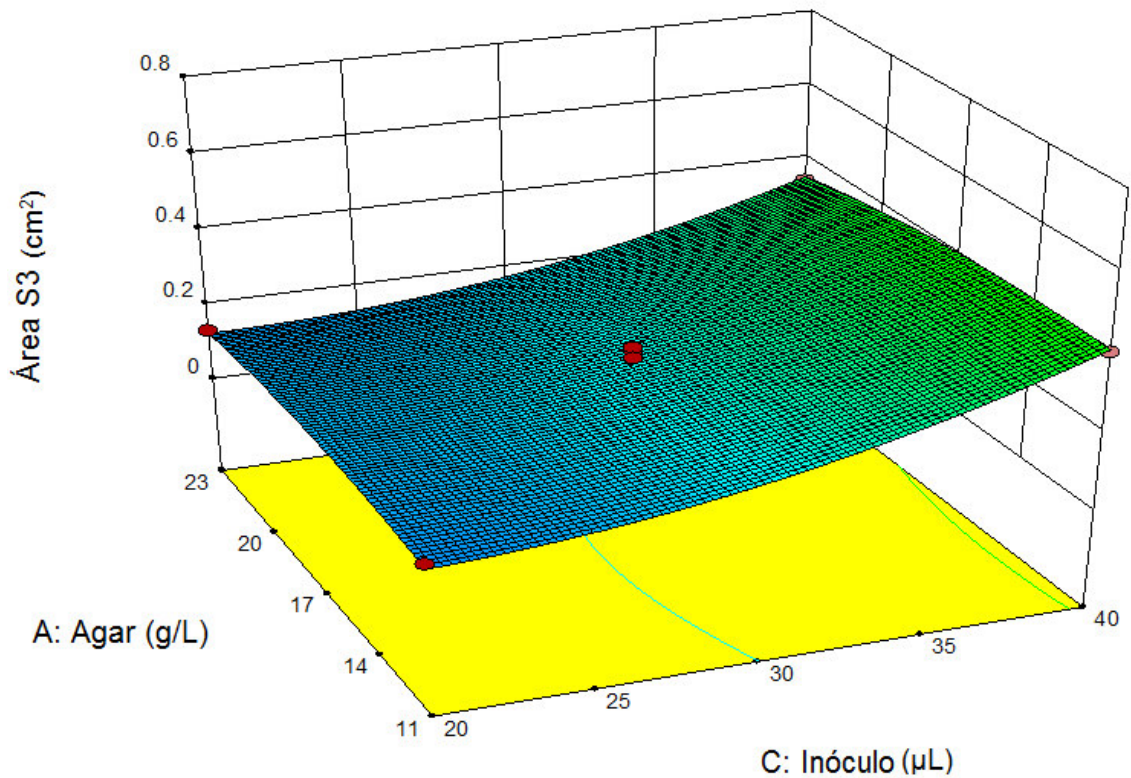


Figura 22. Superficie de respuesta del área S3 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L.

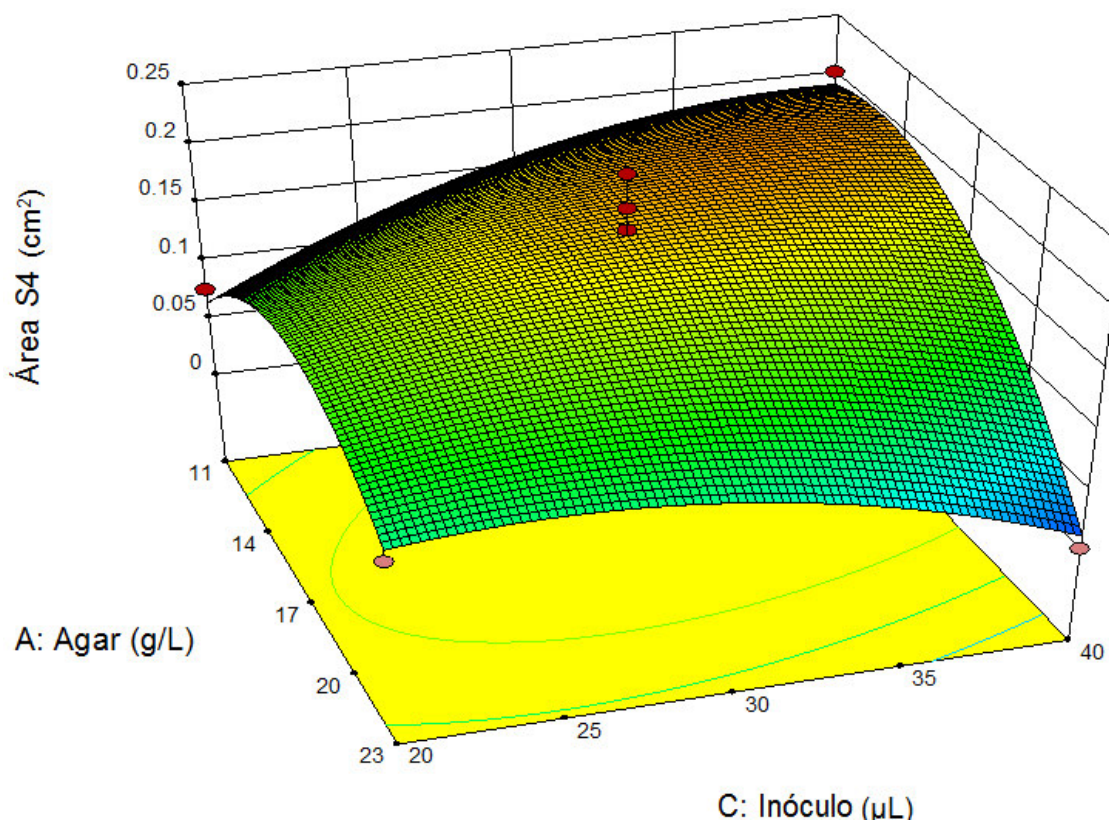


Figura 23. Superficie de respuesta del área S3 para una concentración de CTAB de 0.2 g/L.

Para cumplir el objetivo de optimización, primero se optó por maximizar las 4 áreas de separación entre las bandas y escoger valores de cada factor dentro del rango evaluado, sin embargo el d_i fue muy bajo tal y como se observa en la tabla 13, por lo que se decidió minimizar el área S4 obteniéndose un d_i de 0.975, el cual es razonablemente aceptable. La concentración óptima de agar fue de 18.617 g/L, la de CTAB, 0.1 g/L y el volumen óptimo de inóculo, 40 μ L. La tabla 14 señala los criterios usados para obtener valores óptimos para una adecuada separación de bandas.

Tabla 13. Valores óptimos de una posible solución maximizando todas las áreas de separación entre las bandas de un patrón de RL

Variable		Criterio	Valor óptimo	Unidad
Factor	Agar	En rango	14.396	g/L
	CTAB	En rango	0.124	g/L
	Inóculo	En rango	40.000	μ L
Respuesta	Área S1	Maximizar	0.324	cm ²
	Área S2	Maximizar	0.147	cm ²
	Área S3	Maximizar	0.683	cm ²
	Área S4	Maximizar	0.086	cm ²
Deseabilidad				0.771

Tabla 14. Valores óptimos para una adecuada separación entre las bandas de un patrón de RL revelados en agar CTAB/MB producidos por *P. aeruginosa* 6K-11

Variable		Criterio	Valor óptimo	Unidad
Factor	Agar	En rango	18.617	g/L
	CTAB	En rango	0.100	g/L
	Inóculo	En rango	40.000	μL
Respuesta	Área S1	Maximizar	0.341	cm ²
	Área S2	Maximizar	0.165	cm ²
	Área S3	Maximizar	0.789	cm ²
	Área S4	Minimizar	-0.005	cm ²
Deseabilidad			0.975	

Este resultado asegura la máxima deseabilidad entre las interacciones CTAB vs. Inóculo. La figura 24 señala estas interacciones cuando se mantiene constante la concentración de agar en 18.617 g/L.

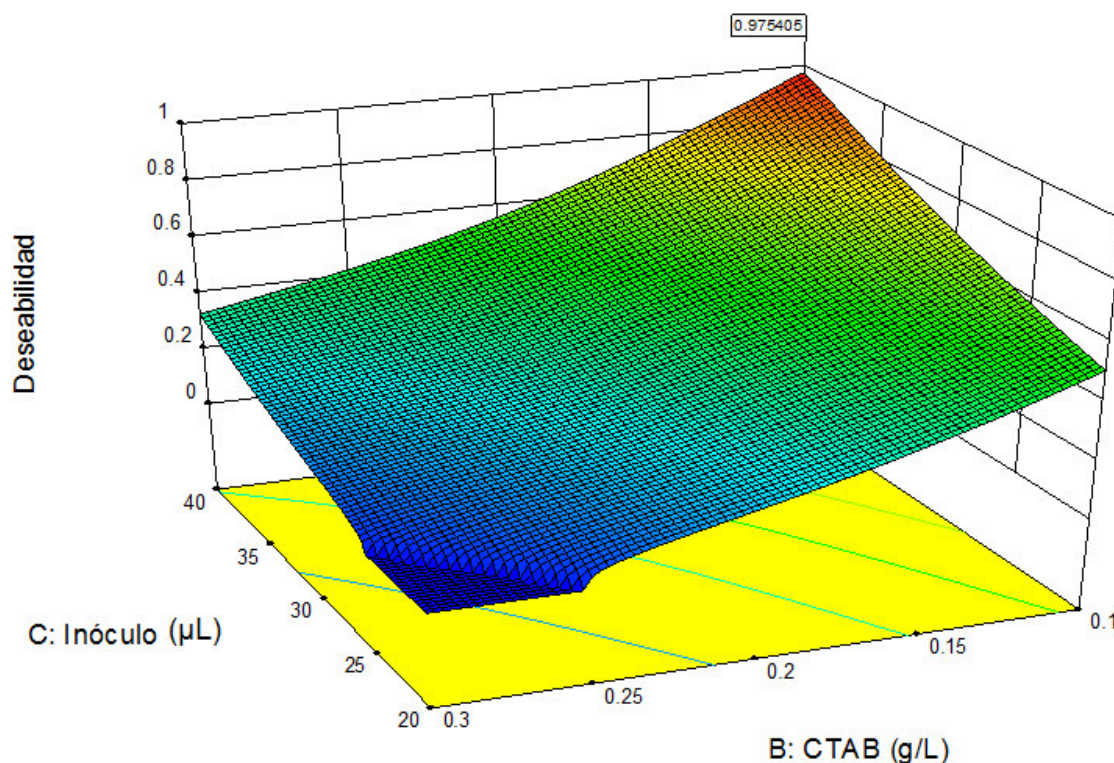


Figura 24. Deseabilidad del diseño compuesto por los 4 modelos matemáticos.

Con estos resultados se procedió a inocular 40 μL de solución acuosa de RL a una concentración de 25 g/L en 20 placas (con 7 pocillos cada una) de agar CTAB/MB con 0.1 g/L de CTAB y 18.6 g/L de agar; obteniendo un total de 140 inóculos. Luego del proceso de incubación y revelado se pudo observar claramente 4 bandas, las que

correspondían a B1, B2, B3 y B4 separadas por S1 (0.34 cm²), S2 (0.17 cm²) y S3 (0.79 cm²). No se pudo distinguir la separación S4. La figura 25 muestra este patrón de halos revelados y sus separaciones entre cada banda a una escala de 5 mm.

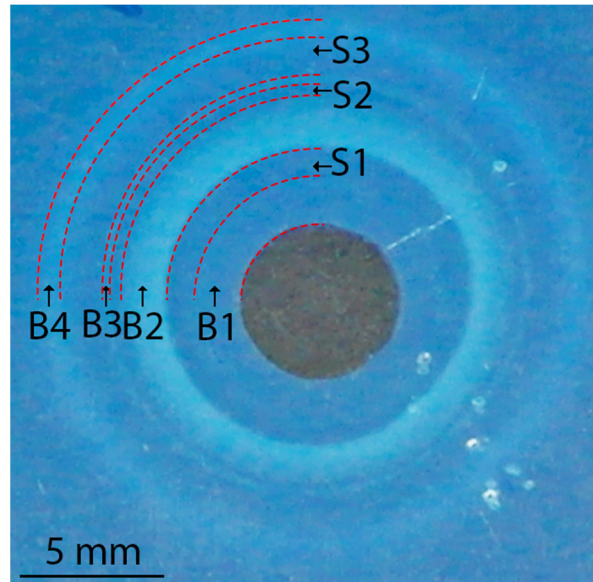


Figura 25. Halos revelados de RL 6K-11 con 3 áreas de separaciones (S) maximizadas.

5.2 Extracción y recuperación de los RL contenidos en las bandas

En el proceso de recuperación de RL a partir del agar CTAB/MB pos-revelado se obtuvieron sustancias de apariencia oleosa (figura 26), las cuales fueron presumiblemente abundantes en RL. La tabla 15 indica la cantidad (en gramos) de la sustancia recuperada por cada banda.



Figura 26. Sustancias oleosas recuperadas de cada banda (B) pos-revelado.

Tabla 15. Cantidad de sustancia oleosa recuperada por cada banda (B) pos-revelado.

Muestra	Peso recuperado (g)
B1	0.0114
B2	0.0458
B3	0.0044
B4	0.0039
Total	0.0655

5.3 Identificación de ramnolípidos mediante UPLC-MS/MS

Inicialmente se obtuvieron 2 cromatogramas correspondientes a las muestras RL estándar y RL 6K-11. Observándose 8 picos en tiempos de retención que van desde 1.75 hasta 3.37 minutos. Se buscaron los iones moleculares y fragmentos iónicos en los t_R de cada uno de estos picos hasta detectar la presencia de los 14 tipos de RL evaluados. Las figuras del 37 al 47, en el anexo 2, presentan los espectros de masas de estos 14 tipos de RL y sus correspondientes diagramas de fragmentación.

Se puede observar que todos los RL tienen una ligera variación en los t_R . También, que para los congéneres Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C_{12:1}-C₁₀, Rha-Rha-C₈-C₁₀ y Rha-Rha-C₁₀-C₈ se detectaron como picos base a sus respectivos iones moleculares. Mientras que para los mono-RL Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-C₁₂-C₁₀ se encontró como pico base a un fragmento de m/z de 169. Por otro lado se detectó al fragmento de m/z de 479 como pico base de Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-Rha-C₁₂-C₁₀. Por último, para Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₀ se detectó como pico base al fragmento de m/z 505 (ver anexo 2).

En la tabla 16 se detallan comparaciones de tiempo de retención y abundancia relativa entre las composiciones de los RL detectados en las muestras patrones. Se puede observar que los tiempos de retención coinciden para cada molécula. El congénere de RL más abundante que se detectó en el patrón RL estándar fue Rha-C₁₀-C₁₀ (71.44% de abundancia relativa), y para el patrón RL 6K-11, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (70.31% de abundancia relativa). Así mismo se puede observar que el congénere Rha-

C_{12:1}-C₁₀ posee la abundancia relativa más baja en ambos patrones (0.012% para el RL estándar y 0.008% para el RL 6K-11).

Tabla 16. Comparación de las composiciones de RL detectados en las muestras RL estándar y RL 6K-11

Estructura Molecular	m/z [M-H] ⁻	<i>t_R</i> (min)		% Abundancia	
		RL estándar	RL 6K-11	RL estándar	RL 6K-11
Rha-C ₈ -C ₁₀	475	1.86	1.86	0.142	0.464
Rha-C ₁₀ -C ₈	475	1.88	1.88	0.095	0.251
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	503	2.60	2.60	71.436	5.994
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	529	3.07	3.07	4.614	0.183
Rha-C _{12:1} -C ₁₀	529	3.13	3.13	0.012	0.008
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	531	3.35	3.35	0.107	0.065
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	531	3.37	3.37	0.040	0.022
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	621	1.75	1.75	0.147	3.607
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	621	1.76	1.76	0.107	1.752
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	649	2.43	2.43	20.427	70.310
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	675	2.87	2.87	2.035	7.320
Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	675	2.93	2.93	0.042	0.223
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	677	3.15	3.15	0.577	7.293
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	677	3.15	3.15	0.219	2.508
Total				100	100

Los resultados que se presentan en las figuras 27 y 28 corresponden al RL estándar y al RL 6K-11. En ellas se detallan los cromatogramas con los 8 picos mencionados que corresponden a los 14 RL detectados mediante UPLC-MS/MS. Con respecto a las bandas de halos revelados se logró identificar hasta 9 de los 14 congéneres de ramnolípidos entre mono-RL (3) y di-RL (6). Las figuras del 29 al 32 detallan un diagnóstico presuntivo de los cromatogramas según los picos encontrados en los *t_R* establecidos y los resultados de los análisis posteriores con los espectros de masas que confirmaron la presencia o ausencia de cada especie ramnolípida en las 4 bandas.

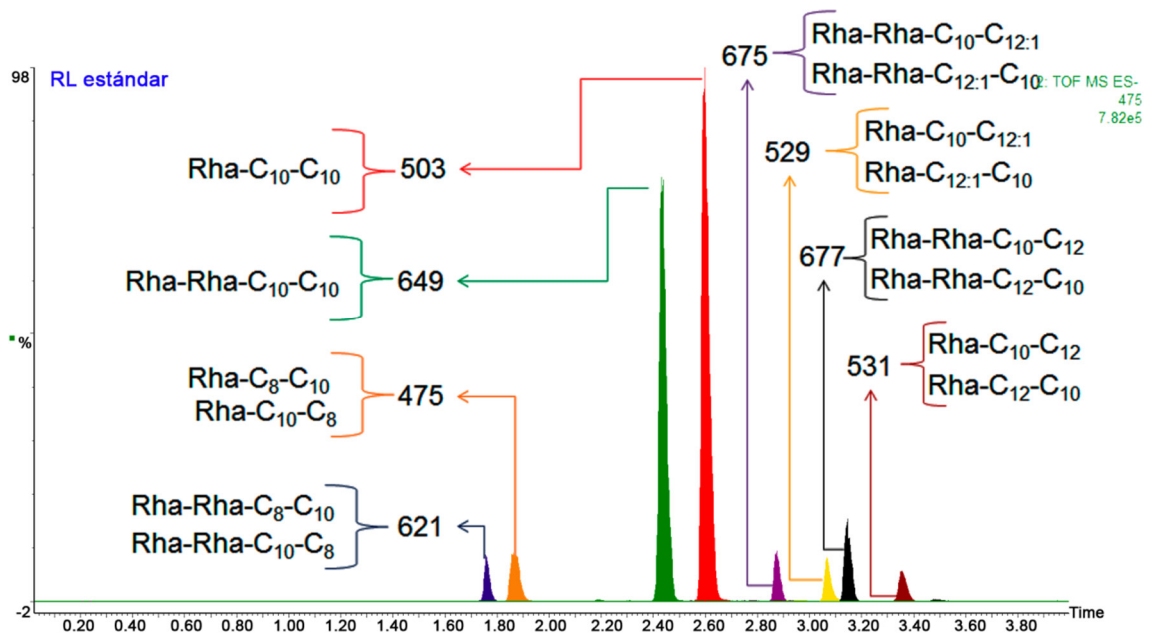


Figura 27. Cromatograma de RL estándar. Detección de 14 tipos de RL por UPLC-MS/MS.

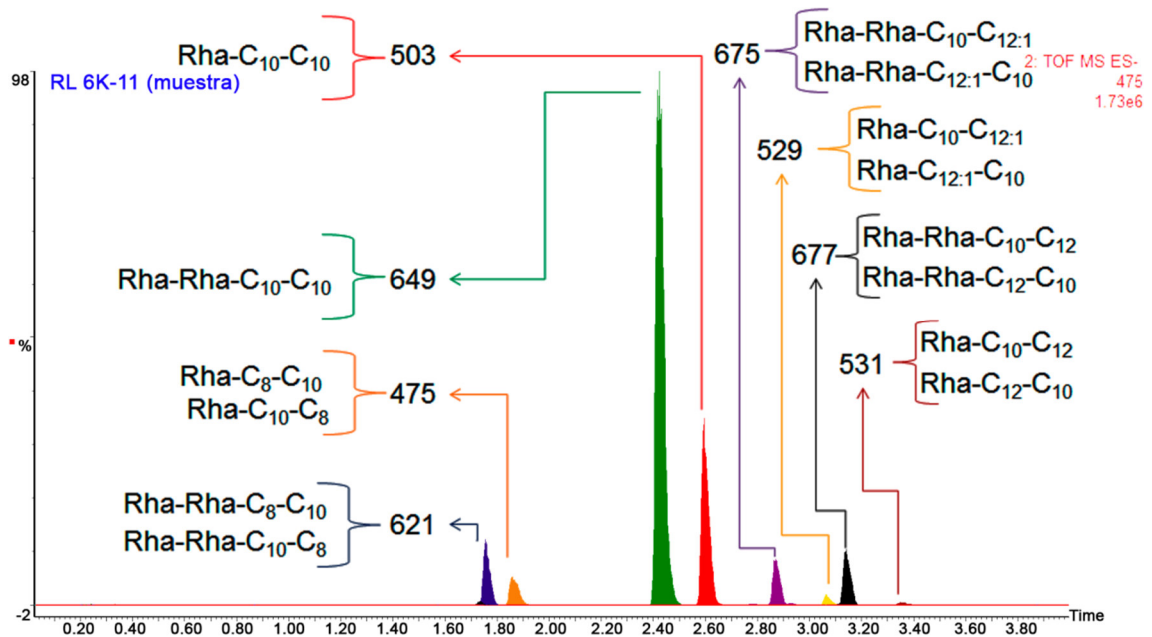


Figura 28. Cromatograma de RL 6K-11, producido por *P. aeruginosa* 6K-11. Detección de 14 tipos de RL por UPLC-MS/MS.

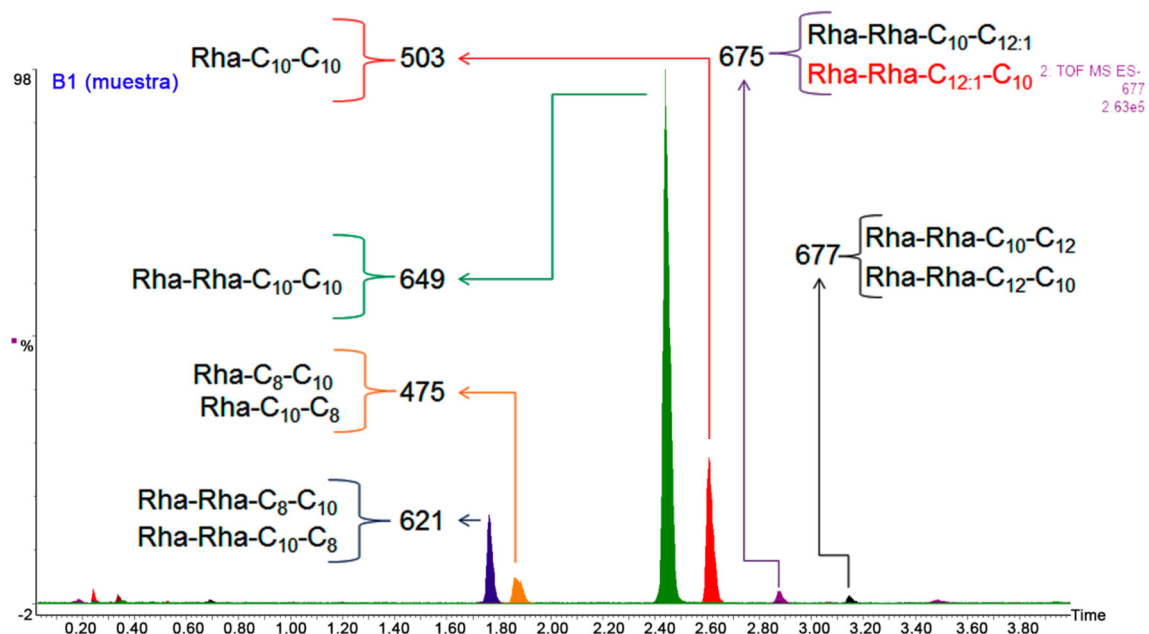


Figura 29. Cromatograma de B1 con diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL. El nombre del RL en color rojo indica que luego del análisis en conjunto con los espectros de masa se descartó la presencia de dicha especie química.

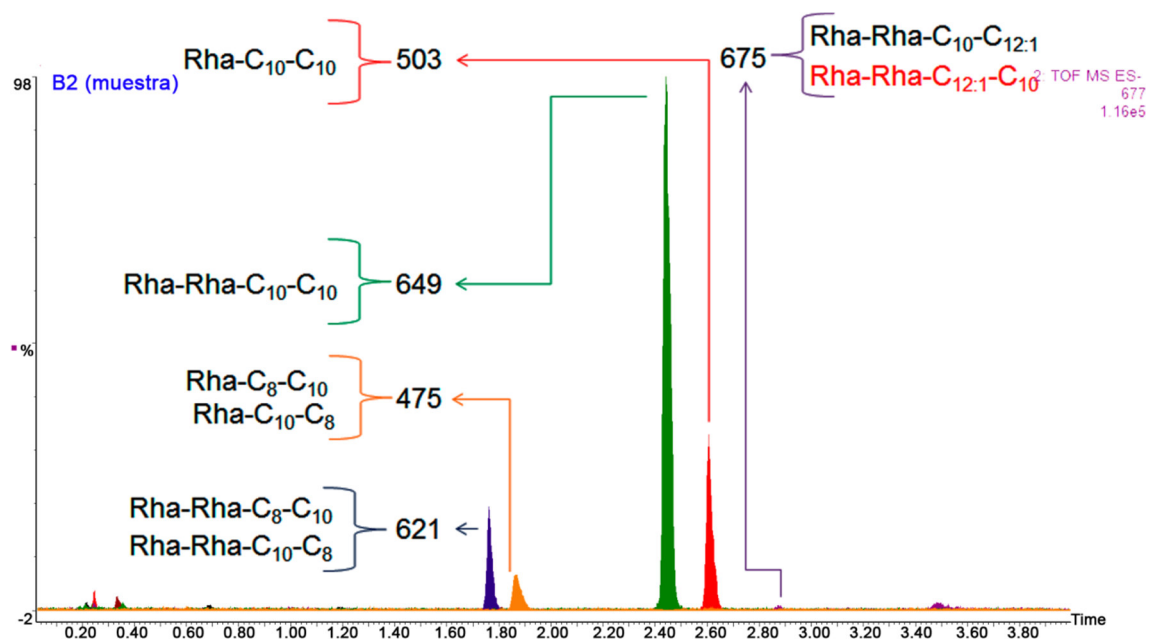


Figura 30. Cromatograma de B2 con diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL. El nombre del RL en color rojo indica que luego del análisis en conjunto con los espectros de masa se descartó la presencia de dicha especie química.

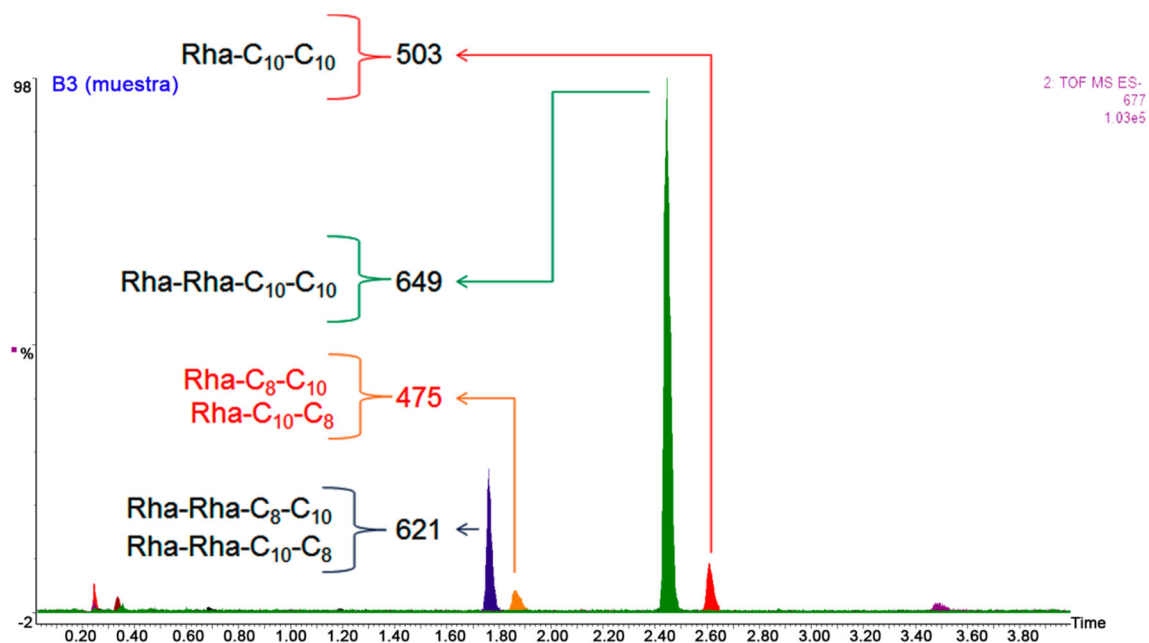


Figura 31. Cromatograma de B3 con diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL. Los nombres de los RL en color rojo indican que luego del análisis en conjunto con los espectros de masa se descartaron las presencias de dichas especies químicas.

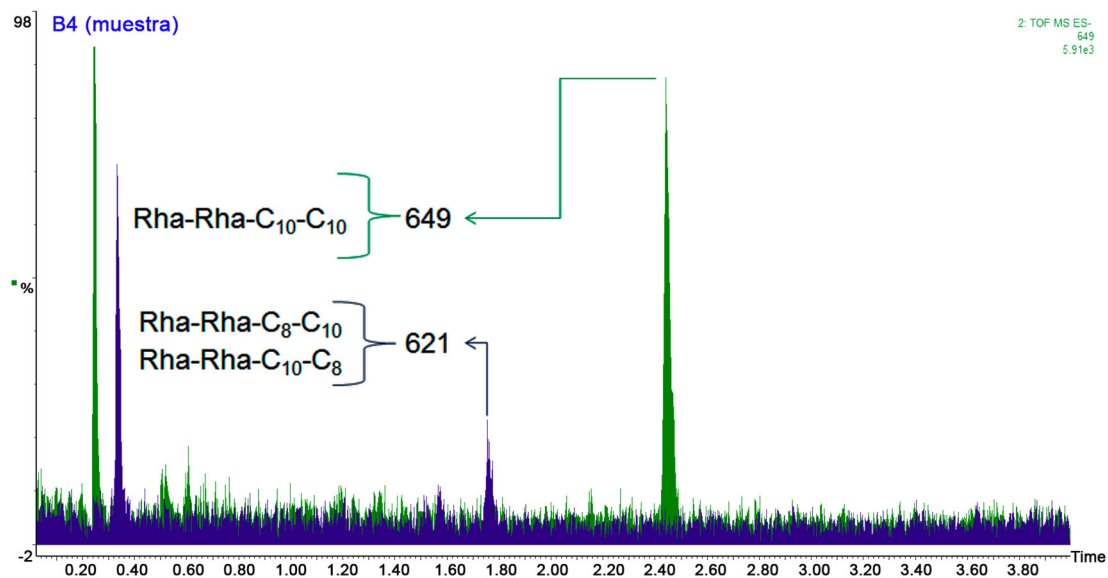


Figura 32. Cromatograma de B4. El diagnóstico presuntivo según el tiempo de retención de cada RL fue confirmado luego del análisis en conjunto con los espectros de masa.

De estos resultados se puede observar que la diversidad de RL disminuye en cada banda. En B1 se encontraron 9 tipos de RL (Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₀ y Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₀), en B2 se encontraron 7 (Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ y Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}), en B3 se encontraron 4 (Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₈ y Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) y en B4 se encontraron 3 (Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀). En la tabla 17 se comparan las composiciones químicas de los RL detectados en cada banda y en el patrón RL 6K-11 según las abundancias relativas calculadas.

Tabla 17. Comparaciones de las composiciones químicas y abundancias relativas de los RL detectados en las 4 bandas reveladas en agar CTAB/MB y el patrón RL 6K-11

Estructura molecular	% Abundancia relativa				
	RL 6K-11	B1	B2	B3	B4
Mono-Ramrólípidos					
Rha-C ₈ -C ₁₀	0.46	0.32	0.52	0	0
Rha-C ₁₀ -C ₈	0.25	0.29	0.60	0	0
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	5.99	2.99	3.16	1.04	0
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	0.18	0	0	0	0
Rha-C _{12:1} -C ₁₀	0.01	0	0	0	0
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	0.06	0	0	0	0
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	0.02	0	0	0	0
Di-Ramrólípidos					
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	3.61	5.86	7.21	10.81	8.40
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	1.75	2.63	3.43	5.16	3.70
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	70.31	82.72	84.10	82.99	87.91
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	7.32	3.06	0.99	0	0
Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	0.22	0	0	0	0
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	7.29	1.58	0	0	0
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	2.51	0.54	0	0	0
Total	100	100	100	100	100

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Optimización de áreas de separación entre bandas

Para la mezcla de RL producida por *P. aeruginosa* 6K-11 (bajo las condiciones de incubación detalladas) las gráficas de superficie muestran claramente que las bajas concentraciones de CTAB (~0.1 g/L) y altos volúmenes de inóculo (~40 µL) favorecen el incremento del área de separación de S1, S2 y S3, cuando se trabaja a concentraciones de 17 g/L de agar. Pero a 11g/L apenas se observa un ligero incremento de las áreas S1 y S3 bajo el efecto del inóculo a 30 µL y CTAB a 0.2 g/L respectivamente. Caso contrario para las áreas afectadas por volúmenes de inóculo de 30 µL (S2 y S3) que tienden a disminuir ligeramente a 11 g/L de agar y a incrementar a 23 g/L de este mismo factor.

Para S4 Los valores intermedios de inóculo (~30µL) y CTAB (~0.2 g/L) ofrecen la mejor separación (al trabajar a 17 g/L de agar), mientras que valores muy altos o muy bajos no permiten su visualización, por solapamiento de bandas (la fusión de B4 y B5 elimina la separación S4). La concentración de agar afecta mucho a la S4 bajo un rango de concentraciones entre 0.15 y 0.25 g/L de CTAB y también a volúmenes superiores a 25 µL.

De lo anterior se desprende que las combinaciones de los factores evaluados afectan de distinto modo en la medida de un área de separación, ya sea S1, S2, S3 o S4. Según Tabuchi *et al.* (2015) si se evalúan bajas concentraciones de CTAB (≤ 0.1 g/L) se conseguirá obtener halos grandes pero poco definidos los cuales no podrían ser objetivamente medidos. Lo mismo ocurre con las áreas de separación: a menores concentraciones de CTAB, las áreas pierden nitidez por fusión halos. Para considerar este efecto en los modelos matemáticos se evaluaron las 4 áreas de separación como un sistema en conjunto, en dónde el máximo o mínimo de un área depende del valor de las otras 3 áreas.

Los cuatro modelos matemáticos para las 4 áreas de separación presentan baja desviación estándar (0.050, 0.024, 0.056 y 0.039) y valores altos de R^2 (0.8250, 0.8128, 0.9920 y 0.9124 para S1, S2, S3 y S4 respectivamente). Esto indica que los modelos son confiables y los valores obtenidos se ajustan a ellos al caer bastante cerca. Los modelos de S1 y S2 son claramente lineales mientras que S3 y S4 son cuadráticos. El efecto de curvatura en estos 2 últimos modelos está dado mayormente por el factor CTAB y $CTAB^2$. En cambio en S1 y S2 el factor agar asegura un modelo lineal por no presentar cambios significativos en las interacciones con los otros factores, esto se puede evidenciar en las gráficas y en la tabla de ANOVA (tabla 12). Los resultados del ANOVA confirman la significancia de los cuatro modelos al presentar valores de p inferiores a 0.05 y valores de falta de ajuste mayores a 0.10.

Un valor de d_i igual 0.771 no es favorable si además de eso el valor óptimo del área de separación S4 maximizado es de 0.086 cm^2 . Esta área es prácticamente imposible de separar manualmente. Minimizando el área en cuestión se obtuvo una fusión entre las bandas B4 y B5 (área S4 matemáticamente igual a -0.005 cm^2). Esto aumentó el d_i a su máximo valor posible (para el sistema compuesto por 4 ecuaciones) lo cual aseguró una mayor probabilidad de obtener resultados reales fieles al sistema propuesto.

Si bien Tabuchi *et al.* (2015) no reportan áreas de separación, sí establecen parámetros ideales para trabajar en un rango confiable con el método de revelado de halos mediante agar CTAB/MB. Estos parámetros incluyen 0.2 g/L de CTAB, 17 g/L de agar y 20 μ L de volumen de inóculo de RL a 25 g/L. Con estos parámetros se realizó la prueba de revelado de halos para el RL 6K-11 y se obtuvieron 0.113 cm^2 para S1, 0.045 cm^2 para S2, 0.255 cm^2 para S3 y 0.175 cm^2 para S4. Estas áreas de separación fueron superadas por las áreas obtenidas gracias a la optimización de parámetros a excepción del área S4, el cual se optó por minimizarlo para reducir el efecto que pueda

tener en el incremento de las otras áreas: 0.341 cm² para S1, 0.165 cm² para S2 y 0.789 cm² para S3.

Para determinar cuántas partes de las cantidades iniciales (áreas sin optimizar) se aumentaron para llegar a las cantidades finales (áreas optimizadas) se calcularon porcentajes de incremento. Para ello se dividió la diferencia entre estas cantidades y las cantidades iniciales, luego se expresó en porcentajes. Se puede afirmar que, aunque los valores de optimización elegidos exigieron la eliminación de una de las separaciones, se consiguió incrementar las otras 3 áreas (S1, S2 y S3) en más de un 200% obteniéndose un promedio de porcentaje de incremento de 144.5% (tabla 18). La figura 33 muestra una comparación entre las áreas de separación antes y después del proceso de optimización.

Tabla 18. Porcentaje de incremento de las áreas de separación optimizadas

Área	Áreas sin optimizar (cm ²)	Áreas optimizadas (cm ²)	% de incremento
S1	0.113	0.341	201.8
S2	0.045	0.165	266.7
S3	0.255	0.789	209.4
S4	0.175	0.000	-100.0
Promedio de % de incremento			144.5

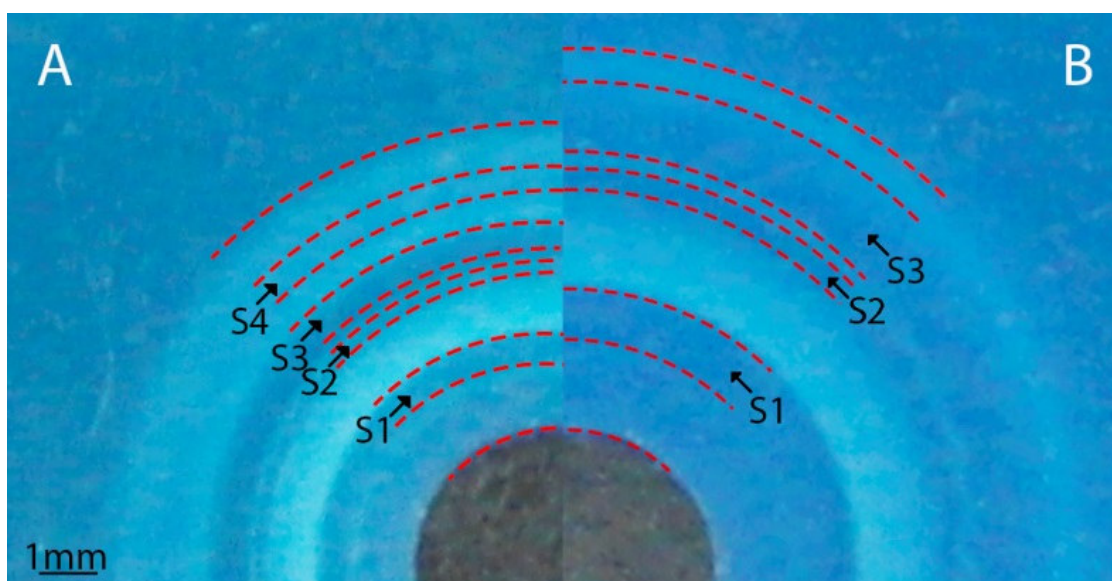


Figura 33. Comparación de las separaciones (S) entre las bandas de halos revelados de *P. aeruginosa* 6K-11 antes (A) y después (B) de un proceso de optimización. **A:** Parámetros recomendados por Tabuchi et al. (2015): 0.2 g/L de CTAB, 17 g/L de agar y 20 µL de inóculo de RL a 25 g/L. **B:** Parámetros optimizados por este trabajo: 0.1 g/L de CTAB, 18.6 g/L de agar y 40 µL de inóculo de RL a 25 g/L.

6.2 Extracción y recuperación de halos revelados

Reiling *et al.* (1986), Wang *et al.* (2007) y Heyd *et al.* (2008) sostienen que obtener un producto ramnolipídico puro a partir de cultivos bacterianos sumergidos supone un alto precio que incluye la separación de los microorganismos, la reducción del volumen de líquido del medio y la precipitación o adsorción de los RL. No se han registrado estudios de recuperación o extracción de RL a partir de medio sólido como el agar CTAB/MB siendo este el primer trabajo que aporta una metodología para la recuperación de RL a partir de este tipo de medio.

Generalmente los métodos más empleados para la purificación de RL separan el líquido del medio a través de la precipitación. De acuerdo con Déziel *et al.* (1999), Zhang y Miller (1992), Van Dyke *et al.* (1993) y Schenk *et al.* (1995) hay dos tipos diferentes de precipitación: ácida y con sulfato de aluminio. Existen ramnolípidos en su forma ácida y son por lo tanto menos solubles en una solución acuosa si se acidifica el medio. El sulfato de aluminio también reduce el pH y precipita ramnolípidos que luego son extraídos más de una vez con un volumen igual o superior de acetato de etilo, éter o cloroformo. Según Mata-Sandoval *et al.* (1999), Smyth *et al.* (2010) y Rudden *et al.* (2015) estas repeticiones favorecen la pureza del extracto, pero al mismo tiempo disminuyen el porcentaje de recuperación de RL.

Las modificaciones realizadas a la técnica de precipitación ácida descrita por Wang *et al.* (2007) y por Giraldo (2012) incluyeron calentar las muestras de bandas de RL a una temperatura de 70°C a la cual los RL aún se mantienen estables. Sin embargo era probable que aún formen complejos iónicos con las moléculas de CTAB, MB y/o HCl por lo que se adicionó 10 mL de solución de NaCl a 0.1 g/mL (agitando la mezcla vigorosamente por 30 minutos) para asegurar la desestabilización de estos complejos.

Con la metodología propuesta se obtuvo un total de 0.0655 g de sustancia oleosa conteniendo RL entre las 4 bandas a partir de 0.14 g de RL iniciales (140 inóculos de 40 μ L a 25 g/L), obteniéndose un porcentaje de recuperación presuntivo de 46.79% (el porcentaje de recuperación es la proporción que equivale al peso recuperado del peso inicial) bastante cerca al 45.02% que se puede obtener promediando los porcentajes de recuperación de RL que reportó Martínez (2015) quien utilizó la metodología de precipitación ácida de Wang *et al.* (2007) modificada por Giraldo (2012) para la purificación y la prueba de resorcinol para la detección de estos biosurfactantes a partir de cultivos sumergidos.

La proximidad descrita podría estar indicando que más del 50% del RL inicial se pudo haber perdido por efecto de la técnica de recuperación original (precipitación ácida); sin embargo, no se puede descartar que también exista un efecto del agar CTAB/MB o sus probables interacciones con los RL, incluyendo el HCl. La cantidad de muestra obtenida, si bien no fue muy alta, fue suficiente para el análisis instrumental.

6.3 Identificación de ramnolípidos mediante UPLC-MS/MS

Al no haber muchos estudios reportados con UPLC para la identificación de RL era necesario determinar los t_R con patrones puros. La mayoría de los reportes sobre caracterización química de RL están descritos con equipos HPLC. En estos equipos los t_R para RL sobrepasan los 7 minutos, por ejemplo: Déziel *et al.* (1999) detectan RL desde el minuto 8 hasta el minuto 23.63; Benincasa *et al.* (2004), desde el minuto 12.4 hasta el minuto 15.6 y Ábalos (2010), desde el minuto 12.2 hasta el minuto 17.2. En cambio en los equipos UPLC los t_R para RL no sobrepasan los 4 minutos: Rudden *et al.* (2015) detectaron RL usando UPLC desde el minuto 0.70 hasta el minuto 2.05 y en este trabajo se detectaron RL desde el minuto 1.75 hasta el minuto 3.37.

Las condiciones del método de análisis, el tipo de columna o el detector MS pueden variar los resultados del t_R incluso si se trata de la misma muestra. La primera metodología validada para la identificación de RL usando UPLC MS/MS fue publicada por Rudden *et al.* (2015) con una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 UPLC (1.8 μm , 2.1×100 mm) y un equipo triple cuadrupolo. En comparación con este trabajo, en el que se utilizó una columna Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μm , 2.1×50 mm) y un equipo UPLC MS-QToF, existieron muchas diferencias en los t_R en los que se detectaron los mismos 14 RL en sendas muestras estándares de RL comercial que corresponden a la misma patente: EP 2410039 A1 (Espacenet, Registro Europeo de Patentes, 2012).

El análisis instrumental para muestras complejas (como en las bandas de halos revelados) exige tener datos de apoyo como los t_R debido a que se pueden obtener algunos picos o espectros de masa que pertenecen a sustancias contaminantes (por ejemplo, en la B4). Esto permite discriminar rápidamente todas las sustancias que no son de interés para el estudio. De esta manera se estableció que hasta el minuto 0.70 de los cromatogramas de las cuatro bandas (figuras del 29 al 32) se pudo evidenciar picos de t_M , que además no aparecen en los cromatogramas de los patrones (figura 27 y 28), lo cual sugiere que en las bandas existe un menor grado de pureza.

De acuerdo con Ábalos (2010) la proximidad en los tiempos de retención de los diferentes congéneres se debe a su similitud estructural. Esto se puede observar mejor comparando isómeros. Por ejemplo para los RL Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-C₁₂-C₁₀ los t_R son muy próximos (3.35 y 3.37 minutos respectivamente). En el caso de Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-Rha-C₁₂-C₁₀ el t_R fue el mismo (3.15 minutos). Lo anterior tuvo como consecuencia que solo se obtengan 8, y no 14, picos correspondientes a todos los tipos de RL detectados. Es decir que todos los isómeros no se resolvieron por cromatografía y, por consiguiente, algunos iones moleculares, de diferentes moléculas, coincidieron en el mismo pico de m/z .

Ya que los iones moleculares de los isómeros tuvieron el mismo valor de m/z , se tuvo que realizar el método de MS/MS con un aumento gradual de la energía de colisión de 25 a 35 eV. Con ello se obtuvieron, en algunos casos, más de un fragmento iónico e incluso se encontraron iones diferentes a los de la tabla 6 con la mayor intensidad (por ejemplo, se encontró al fragmento de m/z 169 que corresponde al pico base de los mono-RL Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-C₁₂-C₁₀). La tabla 19 resume los resultados obtenidos en los espectros de masas y asigna fracciones de RL a los valores encontrados.

La fragmentación del enlace éster (C–O) es la más importante porque permite diferenciar y confirmar la presencia de los isómeros específicos en cada muestra. En los espectros de masa de los mono-RL Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1} y Rha-C₁₀-C₁₂ se pueden observar picos que corresponden al ion de m/z 333 (figuras 38, 39, 40 y 42). De acuerdo con Ábalos (2010) este ion es característico de mono-RL que tienen la cadena lipídica proximal compuesta por 10 carbonos, ya que es el resultado de la fragmentación del enlace éster que une a las cadenas lipídicas (Rha-C₁₀). Lo mismo ocurre para el fragmento iónico de m/z 479 detectado en Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1} y Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (figuras 43, 44, 45 y 47) debido a que corresponden al fragmento de di-ramnolípidos que tienen la cadena lipídica proximal compuesta por 10 carbonos (Rha-Rha-C₁₀).

En los mono-RL Rha-C₈-C₁₀ y Rha-C₁₀-C₈ se detectó a la fracción m/z 312. Según Behrens *et al.* (2016) y Déziel *et al.* (1999) corresponde a una reacción similar a la ruptura del enlace O-glicosídico que tiene como producto a las dos cadenas lipídicas de 8 y 10 carbonos aún unida (C₈-C₁₀ y C₁₀-C₈). Esta fracción refuerza el diagnóstico de tener estos isómeros entre las muestras, pero no los diferencia. No se encontraron fracciones de L-ramnosa conocidos entre los espectros de masas de estos RL tampoco fragmentos correspondientes a cada uno de sus ácidos grasos.

Tabla 19. Asignación de los RL identificados en la muestra RL 6K – 11

Estructura molecular	t_R (min)	[M-H] ⁻	m/z										Anexo 2
			Fragmentos iónicos producidos										
Mono-Ramno lípidos													
Rha-C ₈ -C ₁₀	1.86	475	R-L ₁	R	L ₁	L ₂	L ₁ -L ₂	Fracción de R				Fig. 37	
Rha-C ₁₀ -C ₈	1.88	475	305	-	-	-	312					Fig. 38	
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	2.60	503	333	-	-	-	312					Fig. 39	
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	3.07	529	333	163	169	169	339	103, 119, 145				Fig. 40	
Rha-C _{12:1} -C ₁₀	3.13	529	359	-	-	-	-					Fig. 41	
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	3.35	531	333	163	169	197	367	103, 119				Fig. 42	
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	3.37	531	361	163	197	169	367	103, 119					
Di-Ramno lípidos													
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	1.75	621	R-R-L ₁	R-R	R	L ₁	L ₂	L ₁ -L ₂	Fracción de R-R				Fig. 43
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	1.76	621	451	309	163	-	-	-	205, 247, 291				
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	2.43	649	479	309	163	-	-	-	205, 247, 291				Fig. 44
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	2.87	675	479	309	163	169	-	-	205, 247, 291				Fig. 45
Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	2.93	675	505	309	163	-	-	-	205, 247, 291				Fig. 46
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	3.15	677	479	309	163	169	197	367	205, 247, 291				Fig. 47
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	3.15	677	507	309	163	197	169	367	205, 247, 291				

R: Ramnosa, L₁: ácido graso proximal, L₂: ácido graso distal

Aparte de los iones moleculares de los mono-RL Rha-C₁₀-C_{12:1} y Rha-C_{12:1}-C₁₀ tan solo se pudieron detectar a los fragmentos iónicos producidos por la escisión del enlace éster. Por el contrario, en el espectro de masas de Rha-C₁₀-C₁₀ se detectaron muchos fragmentos iónicos: 103, 119, 145, 163, 169 y 339. De acuerdo con Déziel *et al.* (2000) y Pereira *et al.* (2012) el fragmento de m/z 163 representa un anillo de ramnosa desprotonado y el fragmento de m/z 145 a este mismo luego de perder un radical -OH y otro protón de H. Los iones con m/z de 103 y 119 corresponden a dos diferentes disociaciones del anillo de ramnosa. El fragmento de m/z 339 es el resultado de la ruptura del enlace O-glicosídico y corresponde a los dos ácidos grasos todavía unidos por el enlace éster (C₁₀-C₁₀). Al romperse, este enlace, se forman dos iones de m/z 169 correspondientes a una cadena de lipídica de 10 carbonos (C₁₀).

En la figura 42 se observa un espectro de masas correspondiente a 2 mono-RL: Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-C₁₂-C₁₀, debido a que dicho espectro de masas incluye a los iones de m/z 531 (ion molecular de ambos isómeros), 333 (fragmento diferencial de Rha-C₁₀-C₁₂) y 361 (fragmento diferencial de Rha-C₁₂-C₁₀). Esto indica que los isómeros no lograron separarse y por ello se debe considerar que los fragmentos de m/z 103, 119, 163, 169, 197 y 367 (también presentes en este espectro de masas) corresponden a las dos moléculas.

Estos resultados coinciden con los reportados por Benincasa *et al.* (2004), Pereira *et al.* (2012) y Tavares *et al.* (2013). El fragmento de m/z 197 corresponde a un ácido graso de 12 carbonos (C₁₂). En Rha-C₁₀-C₁₂ es el fragmento más pequeño de la ruptura del enlace éster. En Rha-C₁₂-C₁₀, es el producto de las fragmentaciones de los enlaces O-glicosídico y éster. El fragmento iónico de m/z 367, en ambos isómeros, es el producto lipídico de la ruptura del enlace O-glicosídico (C₁₀-C₁₂ y C₁₂-C₁₀).

En todos los espectros de masa de los di-RL se detectaron a los fragmentos iónicos de m/z 163, 205, 247, 291 y 309. Según Pereira *et al.* (2012) el fragmento iónico de m/z 309 es el resto hidrófilo de la ruptura del enlace O-glicosídico que separa

a las dos ramnosas de los dos lípidos en los di-RL (Rha-Rha). Denekamp *et al.* (2000) afirman que el fragmento iónico de m/z 205 es muy frecuente y corresponde a dos disociaciones consecutivas que escinden a una de las dos ramnosas del ion m/z 309. Monteiro *et al.* (2007) también detectaron al fragmento iónico de m/z 205 entre todos los espectros de masa de los 6 di-RL que produjo la cepa de *P. aeruginosa* DAUPE 614. Cabe resaltar que el perfil de producción de esta cepa es muy parecido al de *P. aeruginosa* 6K-11. Behrens *et al.* (2016) reportaron el amplio perfil de producción de RL de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KT2440 pVLT33_rhIABC conteniendo 12 di-RL en los que también se detectaron el fragmento iónico de m/z 205.

Según Monteiro *et al.* (2007), Pereira *et al.* (2012) y Behrens *et al.* (2016) los iones de m/z 247 y 291 corresponden a una fragmentación de origen similar al del ion de m/z 205. El fragmento de m/z 163, también presente en todos los espectros de masa de di-RL, corresponde a la ruptura del enlace glucosídico que une a las dos ramnosas. Este ion también ha sido reportado por Haba *et al.* (2003), Monteiro *et al.* (2007), Ábalos (2010), Pereira *et al.* (2012), Tavares *et al.* (2013) y Behrens *et al.* (2016) en los espectros de masa de sus respectivos di-RL.

El perfil de producción de RL puede variar de acuerdo a diversos factores. Los más estudiados son la cepa y la fuente de carbono. Según la metodología empleada se puede afirmar que la cepa de *P. aeruginosa* 6K-11, por lo menos, produce los 14 tipos de RL más frecuentes, utilizando como fuente de carbono al glicerol. Rudden *et al.* (2015) reportaron un perfil de producción de RL de *P. aeruginosa* ST5, cultivada con glicerol, que no produjo ni a Rha-C_{12:1}-C₁₀ ni a Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₀, pero sí los otros 12 RL. Monteiro *et al.* (2007) también utilizaron glicerol para detectar el perfil de producción de RL de *P. aeruginosa* DAUPE 614 y encontraron a 13 de los 14 RL más frecuentes. Rha-C_{12:1}-C₁₀ fue el que no detectaron.

Diversos estudios confirman que los RL Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C_{12:1}-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-C₁₂-C₁₀ y Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₀ presentan la menor abundancia relativa de los perfiles de producción de sus correspondientes cepas y, por otro lado, el RL Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ presenta, en todos los casos, la mayor abundancia relativa: Déziel *et al.* (1999), Haba *et al.* (2003), Monteiro *et al.* (2007), Ábalos (2010), Tavares *et al.* (2013), Rudden *et al.* (2015) y Behrens *et al.* (2016). Este trabajo no fue la excepción. Para los RL con menor abundancia relativa mencionados tan solo se detectaron porcentajes de abundancia inferiores a 0.23%; por el contrario, para Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ se detectó 70.4%, siendo el RL más abundante del perfil de producción de *P. aeruginosa* 6K-11.

Ábalos (2010) menciona que cuando están presentes los dos isómeros, de un determinado par, aquel que posea la cadena carbonada más corta directamente unida al anillo de α -L ramnopiranosil es el más abundante. Esto se confirma con los resultados expuestos en la tabla 16 y concuerdan con los obtenidos por Déziel *et al.* (2000), Haba *et al.* (2003) y Monteiro *et al.* (2007). Básicamente esto sugiere que el perfil de producción de RL de *P. aeruginosa* puede mantener una cierta proporción entre sus productos, pero varía de acuerdo a la cepa.

En la tabla 16 se observa que el RL Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ posee una abundancia relativa de 20.4% para el RL estándar. Este resultado no cumple con lo mencionado anteriormente. Ábalos (2010) sugiere que el mono-RL Rha-C₁₀-C₁₀ es el precursor del di-RL Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ en la ruta metabólica de *P. aeruginosa* y por ello es probable que esta mezcla haya sido purificada de un cultivo joven o mutante.

Por otro lado los resultados del análisis de cada banda sí mostraron diferencias en cuanto a composición química y abundancia (entre sí y con los patrones). En las figuras del 29 al 32 se observan que en las bandas no se detectaron 5 especies de RL que sí están presentes en la muestra original (RL 6K-11), debido a que no se encontraron los iones moleculares en sus determinados t_R . De la tabla 17 podemos advertir que dichos 5 RL poseían abundancias relativas menores a 0.23% del total de

ramnolípidos de *P. aeruginosa* 6K-11. Esto podría indicar que los RL con bajas concentraciones, en una mezcla purificada, no son detectados según la metodología empleada de espectrometría de masas luego de un tedioso proceso que incluya el revelado de halos y la técnica de extracción a partir de agar CTAB/MB.

En la figura 29 (B1) y en la figura 30 (B2) se observan picos a t_R de 2.87 a 2.90 minutos correspondientes solo a Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1} y no a su isómero. Esto se determinó debido a que, entre los tiempos mencionados, solo se detectó al fragmento iónico de m/z 479 y no al de m/z 505. En estas figuras también se observa que el pico que aparece de 1.80 hasta 1.87 minutos corresponde a Rha-C₈-C₁₀ y Rha-C₁₀-C₈, pero en la figura 31 (B3), a pesar de que también existe un pico resuelto (con una abundancia relativa ~2%) en ese mismo lapso, no se pudo detectar al ion molecular de m/z 475, descartando la presencia de estos RL en la B3. Probablemente las cantidades de estos últimos isómeros fueron tan bajas que los iones producidos no alcanzaron una señal significativa.

Rudden *et al.* (2015) afirman que un análisis cuantitativo con LC-MS requiere de una curva de calibración con estándares altamente puros. De acuerdo con Yin (2014) el aislamiento de un solo tipo de RL de una mezcla es técnicamente alcanzable pero no es rentable, sobre todo después de una purificación por precipitación ácida y extracción con disolventes orgánicos que por lo general no son muy baratos. Es por ello que se empleó la alternativa de un análisis semicuantitativo según el porcentaje de abundancia relativa.

En la comparación de la tabla 17 se puede observar que la composición química de cada muestra es diferente. Las abundancias relativas también lo son. El di-RL Rha-Rha-C₁₀-C₈ tiene el 5.2% de la abundancia relativa en la B3. En B1 se detectó con 2.6% y en B2, con 3,43%. A simple vista podría parecer que en B3 existe mayor cantidad de Rha-Rha-C₁₀-C₈ que en las otras bandas, pero en realidad solo aumentó su concentración. Lo mismo ocurre para Rha-Rha-C₈-C₁₀ y Rha-Rha-C₁₀-C₁₀. El

comparar las abundancias relativas en menor cantidad de congéneres de RL (para cada banda) aumentará la concentración de los que RL sí fueron detectados. Esto se resuelve en la tabla 20. Debido a que las bandas representan partes diferentes de una misma unidad (RL revelados de *P. aeruginosa* 6K-11) sus abundancias relativas también se pueden calcular tomando en cuenta como al 100% a la suma de todas las áreas de los iones de referencia. Esto permite comparar la migración de los RL a través de las bandas

Tabla 20. Nuevas comparaciones de las abundancias relativas de los RL detectados en las 4 bandas reveladas en agar CTAB/MB y el patrón RL 6K-11

Estructura molecular	Masa* (Da)	% Abundancia relativa				
		RL 6K-11	B1	B2	B3	B4
Mono-Ramrólípidos						
Rha-C ₈ -C ₁₀	476	0.46	0.18	0.12	0	0
Rha-C ₁₀ -C ₈	476	0.25	0.17	0.14	0	0
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	504	5.99	1.70	0.75	0.19	0
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	530	0.18	0	0	0	0
Rha-C _{12:1} -C ₁₀	530	0.01	0	0	0	0
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	531	0.06	0	0	0	0
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	531	0.02	0	0	0	0
Di-Ramrólípidos						
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	622	3.61	3.33	1.70	1.99	0.11
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	622	1.75	1.49	0.81	0.95	0.05
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	650	70.31	46.96	19.80	15.24	1.16
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	676	7.32	1.74	0.23	0	0
Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	676	0.22	0	0	0	0
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	678	7.29	0.90	0	0	0
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	678	2.51	0.31	0	0	0
Total		100		100		

*Da: Dalton o unidad de masa atómica. Unidad de masa que se define como la doceava parte (1/12) de la masa de un átomo, neutro y no enlazado, de carbono-12.

La estructura molecular es probablemente el factor más importante en la migración de los RL. En la tabla 20 se puede observar que la relación de la presencia de isómeros se mantiene en las cuatro bandas, aunque no presenten el mismo porcentaje de abundancia (Rha-C₈-C₁₀ y Rha-C₁₀-C₈ migran hasta B2; Rha-Rha-C₈-C₁₀ y Rha-Rha-C₁₀-C₈ migran hasta B4; Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-Rha-C₁₂-C₁₀ solo migran en B1).

Existe predominancia de di-RL en la migración. Se pudo identificar al di-ramnolípido Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ como el más abundante en todas las bandas. El mono-RL Rha-C₁₀-C₁₀ con una abundancia relativa de 6.0% en la muestra RL 6K-11 tan solo migró hasta B3, y llegó hasta dicha banda con 0.19%. A diferencia de los di-ramnolípidos Rha-Rha-C₈-C₁₀ y Rha-Rha-C₁₀-C₈ con abundancias de tan solo 3.6% y 1.8% respectivamente de la muestra RL 6K-11 que migraron hasta B4 y pasaron por B3 con 2.0% y 1.0% (respectivamente) superiores a Rha-C₁₀-C₁₀. Estos resultados sugieren que la migración de RL podría tener una relación con la cantidad de ramnosas.

Dentro del grupo de di-RL detectados los que migraron más (hasta B4) han sido los que tienen menor masa [Rha-Rha-C₈-C₁₀ (622 Da), Rha-Rha-C₁₀-C₈ (622 Da) y Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (650 Da)]. Los di-RL Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1} (676 Da), Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (678 Da) y Rha-Rha-C₁₂-C₁₀ (678 Da) con abundancias relativas de 7.3%, 7.3% y 2.5%, respectivamente del RL 6K-11, no migraron más que hasta B2 (Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}) y B1 (los otros dos di-RL, que tienen mayor masa molecular). Por lo tanto, esto sugiere que también existe una influencia de la masa en la migración y que no se puede establecer una mínima cantidad de abundancia suficiente que asegure la detección de un mismo RL en la siguiente banda.

En general, se puede afirmar que en la migración de RL los mono-RL han ido disminuyendo su abundancia relativa conforme se desplazaron a lo largo del agar CTAB/MB y, los di-RL disminuyeron aproximadamente el doble de su abundancia relativa para pasar de B1 a B2, en B3, incluso, aumentaron su abundancia relativa en comparación a B2 y en B4, la disminuyeron drásticamente.

La solución acuosa de RL que se inoculó en el agar CTAB/MB tuvo un pH igual a 9. Según Sánchez (2010) en una solución acuosa de di-RL con valores de pH mayores a 7.4 existen más del 98% de moléculas cargadas negativamente. Las repulsiones electrostáticas entre las moléculas de di-RL cargadas negativamente

hacen más difícil su asociación en agregados micelares. Es muy probable que los componentes del agar CTAB/MB podrían haber formado asociaciones iónicas con estos RL cargados, tal y como lo sugieren Siegmund y Wagner (1991). Los grados de interacción entre el CTAB, el MB y los RL a las condiciones dadas de temperatura y pH (pre-revelado) podrían explicar mejor la formación de los diferentes halos.

Los resultados que se obtuvieron con el desarrollo de este trabajo son insuficientes para describir estas interacciones. Incluso para encontrar una relación matemática que explique la migración de RL en el agar CTAB/MB se necesita estudios más especializados que recolecten información sobre los componentes del medio sólido durante el proceso de incubación y revelado. No se pudo establecer una relación entre el perfil de producción de RL de *P. aeruginosa* 6K-11 y su patrón de halos revelados de RL en agar CTAB/MB.

VII. CONCLUSIONES

- Se comprobó la existencia de diferencias en cuanto a composición química y abundancia de los diferentes tipos de ramnolípidos de *P. aeruginosa* 6K-11 acomplejados en cada banda de los halos de precipitación. Se concluye que los factores más importantes para la formación de halos son: la abundancia de una especie de ramnolípidos y la estructura molecular (cantidad de ramnosas, isomería y masa).
- Se obtuvo un promedio de incremento de 144.5% de las áreas de separación entre las bandas de halos revelados de RL de *P. aeruginosa* 6K-11 en agar CTAB/MB, con respecto a la técnica sin optimizar, estableciendo nuevos parámetros de concentraciones de agar (18.617 g/L) y de CTAB (0.1 g/L) y un volumen óptimo de inóculo (40 μ L) mediante una metodología de superficie de respuesta de Box-Behnken.
- La técnica de recuperación de RL a partir de agar CTAB/MB no resultó completamente eficiente, puesto que, en las bandas no se detectaron a 5 tipos de RL (con abundancia relativa < 0.23% de los RL producidos por *P. aeruginosa* 6K-11). Además, se observaron contaminantes.
- Se detectaron 14 tipos de RL producidos por *P. aeruginosa* 6K-11: RC₈C₁₀, RC₁₀C₈, RC₁₀C₁₀, RC₁₀C_{12:1}, RC_{12:1}C₁₀, RC₁₀C₁₂, RC₁₂C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀, RRC₁₀C_{12:1}, RRC_{12:1}C₁₀, RRC₁₀C₁₂ y RRC₁₂C₁₀. Luego del revelado y la extracción se detectaron 9 RL en la banda 1 (RC₈C₁₀, RC₁₀C₈, RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀, RRC₁₀C_{12:1}, RRC₁₂C₁₀ y RRC₁₀C₁₂), 7 en la banda 2 (RC₈C₁₀, RC₁₀C₈, RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀ y RRC₁₀C_{12:1}), 4 en la banda 3 (RC₁₀C₁₀, RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈ y RRC₁₀C₁₀) y 3 en la banda 4 (RRC₈C₁₀, RRC₁₀C₈, RRC₁₀C₁₀).

VIII. RECOMENDACIONES

Para entender más acerca de la naturaleza y las propiedades de los RL se recomienda realizar estudios que evalúen, en el tiempo, el proceso de formación de halos. Además de recolectar información sobre las posibles interacciones con los componentes del medio sólido. La técnica de revelado de RL en agar CTAB/MB y HCl, luego de estos estudios, podría tener un mayor valor agregado, sobre todo de separación molecular de RL, si se establecen mejores parámetros para este fin; por ejemplo, podría probarse eliminando o disminuyendo la cantidad de componentes innecesarios (sales o glicerol), usando componentes más puros (agarosa en lugar de agar) y estableciendo concentraciones óptimas (de azul de metileno, de CTAB y de HCl).

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica se recomienda hacer estudios comparativos con diferentes extractos ramnolipídicos, que bien pueden haberse producido por diferentes cepas o con diferentes nutrientes, por ejemplo, una misma cepa con diferentes fuentes de carbono. También es recomendable estandarizar los patrones por medio de Cromatografía Flash, con el fin de poder realizar análisis cuantitativos para cada congénere de RL.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A., PINASO, A., INFANTE, M.R. *et al.* A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 2001. Vol. 17, p. 1367-1371

ÁBALOS, Arelis. Caracterización química de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a partir de residuos de aceite de soja mediante HPLC-EM. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2010. Vol. 41, No. 3, pp. 155-159.

ABDEL-MAWGOUD, A., RUDOLF, H., LÉPINE, F. *et al.* Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. En: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (edit.) *Biosurfactants*. EE.UU. Microbiology Monographs Springer-Verlang. 2011. Vol. 20, p. 13-56.

ABIÁN, J., M. CARRASCAL y M. GAY. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. 2008. Junta Directiva, 2008, p. 16.

ARIAS, A. “Estudio analítico de especies metálicas, Biomoléculas y metalobiomoléculas en Alimentos como marcadores de calidad y Autenticidad”. Asesores: José Luis Gómez Ariza y Tamara García Barrera. Tesis grado de Doctor. Universidad de Huelva, Huelva, 2008.

ARINO, S., MARCHAL, R. and VANDECASTEELE, J. P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996. Vol. 45, pp. 162-168.

BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVERA, I. *et al.* Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, vol. 85, no 1, p. 1-8.

BEHRENS, Beate, ENGELEN, Jeannine, TISO, Till *et al.* Characterization of rhamnolipids by liquid chromatography/mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, vol. 408, no 10, p. 2505-2514.

BODOUR, A.A., DREES, K.P. and MAIER, R.M. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. Vol. 69(6), pp. 3280-3287.

BOYLE, James G. and WHITEHOUSE, Craig M. Time-of-flight mass spectrometry with an electrospray ion beam. *Analytical chemistry*, 2002, vol. 64, no 18, p. 2084-2089

CAIAZZA, N.C., SHANK, R.M. and OTOOLE, G.A. Rhamnolipids modulare swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Biol.Chem.* 2005. Vol. 238, 2595-2602.

CASTRO, A. Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en *tandem* a la determinación de antidepresivos en plasma y fluido oral. Universidad de Santiago de Compostela. 2007.

CHANDRASEKARAN, E.V. and BEMILLER, J.N. Constituent analysis of Glycosaminoglycans. In: R. L. Whistler & J. N. BeMiller, eds. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York: Academic Press. 1980. p. 89–96.

CHRZANOWSKI, L., LAWNICZAK, L. and CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, vol. 28, pp. 401-419.

CORNELL, John A. *How to apply response surface methodology*. Milwaukee, WI: ASQC, 1990.

DAVEY, M. E., CAIAZZA, N. C. and OTOOLE, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J.Bacteriol.* 2003. Vol. 185, p. 1027-1036.

DESAI, J. and BANAT, I. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997. Vol. 61(1): 47–64.

DÉZIEL, E., LÉPINE, F., DENNIE, D. *et al.* Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1440(2-3), p. 244–252.

DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S. *et al.* Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000. Vol. 1485(2). 145-152.

DENEKAMP, Chagit; CLAEYS, Magda and POCSFALVI, Gabriella. Mechanism of cross-ring cleavage reactions in dirhamnosyl lipids: effect of the alkali ion. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, vol. 14, no 9, p. 794-799.

EL COMERCIO. “Derrames de petróleo”. En: Página oficial del diario El Comercio. [En línea]. Mayo, 2016. [Citado 21 de mayo del 2016]. Disponible en: <<http://elcomercio.pe/tag/136325/derrame-de-petroleo>>

IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1997. [Citado 27 de mayo del 2016]. Disponible en: <<http://goldbook.iupac.org>> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.

ESCALANTE, R. “Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios”. Asesor: Fernando Merino. Tesis de Maestría en Biotecnología. UNMSM, Lima, 2002.

FERNÁNDEZ, C., VELA, M., IBARRA, G. y GONZÁLEZ, I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta pediátrica de México*, 2009, VOL. 30, NO 5, P. 258-263.

GESTIÓN. “Producción de sector Minería e Hidrocarburos aumentó 9.25% en abril”. En: Página oficial del diario Gestión. [En línea]. 01 de Junio del 2015. [Citado 18 de noviembre del 2015]. Disponible en: <<http://gestion.pe/economia/produccion-sector-mineria-hidrocarburos-aumento-925-abril-2133474>>

GIRALDO ZAMBRANO, Johnny Daniel. "Producción de rhamnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* Pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados". Asesora: Susana Gutiérrez. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2012.

GUNTHER IV, N.W. NUÑEZ, A., FETT, W. *et al.* Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71, n° 5, p. 2288-2293. <doi: 10.1128/AEM.71.5.2288–2293.2005>

HABA, E., ABALOS, A., JÁUREGUI, O. *et al.* Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Surfactants and Detergents, 2003, vol. 6, no 2, p. 155-161.

HELBERT, J.R. and BROWN, K.D. Color Reaction of Anthrone with Monosaccharide Mixtures and Oligo- and Polysaccharides Containing Hexuronic Acids. Analytical Chemistry. 1957. Vol. 29(10), p. 1464–1466.

HEYD, M., KOHNERT, A., TAN, T.H. *et al.* Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2008. Vol. 391, p.1579–1590. <doi: 10.1007/s00216-007-1828-4>

INEI. "Economía peruana crece por 15 años consecutivos". En: Página oficial de la [En línea]. 22 de Febrero del 2014. [Citado 18 de noviembre del 2015]. Disponible en: <<http://www.inei.gov.pe/media/MenuRecursivo/noticias/nota-de-prensa-no-022-2014-inei.pdf>>

JARAMILLO, A. C., ECHAVARRÍA, A. M. y HORMAZA, A. Diseño Box-Behnken para la optimización de la adsorción del colorante azul ácido sobre residuos de flores. Ingeniería y Ciencia, 2013, vol. 9, no 18, p. 75-91.

MARTÍNEZ CANO, Diandra Gisell. "Optimización de la fuente de carbono para la producción de un surfactante rhamnolípido por una cepa nativa de *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11". Asesor: Fernando Merino Rafael. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Microbiología y Parasitología, Lima, 2015.

MARTÍNEZ, E.P. y OSORIO, J.A. Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.). De Bary. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2007. Vol. 8 n° 2, p. 5-16.

MATA-SANDOVAL, J.C., KARNS, J. and TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. Journal of Chromatography A, 1999. Vol. 864, p. 211–220.

MONTEIRO, Safi A., SASSAKI, Guilherme L., DE SOUZA, Lauro M. *et al.* Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. Chemistry and physics of lipids, 2007, vol. 147, no 1, p. 1-13.

MONTGOMERY, Douglas C. Diseño y análisis de experimentos. 1991.

MULLIGAN, C. N. and GIBBS, B. Types, production and applications of biosurfactants. Proceedings of the Indian National Science Academy. 2004. Vol. 70, pp. 31-55.

MUNDO AZUL (ONG). “Derrames de petróleo en el Perú”. En: Página oficial de la ONG Mundo Azul. [En línea]. Julio 2012. [Citado 18 de noviembre del 2015]. Disponible en: <<http://peru.mundoazul.org/cero-contaminacion/petroleo-el-peligro-negro/accidentes-y-derrames-de-petroleo/derrames-de-petroleo-en-el-peru/>>

NAVON-VENEZIA, S., ZOSIM, Z., GOTTLIEB, A. *et al.* Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Applied and environmental microbiology, 1995, vol. 61, no 9, p. 3240-3244.

PERFUMO, A., BANAT, I. CANGANELLA, F. *et al.* Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. Applied Microbiology and Biotechnology. 2006. Vol. 72, p. 132–138.

PERÚ. Decreto Supremo (DS). Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos. El Peruano, 14 de mayo de 2006, núm. 015-2006-EM, p. 5.

PERÚ. Ley del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental. El Peruano, 23 de abril del 2001, núm. 27446, p. 30.

PERÚ. Ley General del Ambiente. El Peruano, 15 de octubre de 2005, núm. 28611, p. 31.

PEREIRA, Jorge, GUDIÑA, E. J., DÓRIA M.L. *et al.* Characterization by electrospray ionization and tandem mass spectrometry of rhamnolipids produced by two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Brazilian crude oil. European Journal of Mass Spectrometry, 2012, vol. 18, no 4, p. 399.

PERÚ 21. “Todo lo que necesitas saber sobre los 2 derrames de petróleo en la Amazonía peruana [Informe]”. En: Página oficial del diario Perú 21. [En línea]. Febrero, 2016. [Citado 21 de mayo del 2016]. Disponible en: <<http://peru21.pe/actualidad/derrame-petroleo-amazonia-todo-lo-que-necesitas-saber-2239595>>

PETROPERÚ. “Petroperú celebra los 150 años del primer pozo petrolero perforado en el Perú y Latinoamérica (y segundo en el mundo)”. En: Página oficial de Petroperú. [En línea]. Octubre 2013. [Citado 07 de febrero del 2016]. Disponible en: <<http://www.petroperu.com.pe/portalweb/Main.asp?Seccion=3&IdItem=502>>

PINZON, N. and JU, L. Improved detection of rhamnolipid production using plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. Biotechnology Letter. 2009. Vol. 31, p. 1583-1588.

REILING, H. E., THANEI-WYSS, U., GUERRA-SANTOS, L. H. *et al.* Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology. 1986. Vol. 51(5), pp. 985-989.

RIKALOVIC, M. G., GOJGIC-CVIJOVIC, G., VRVIC, M. M. *et al.* Comparative Analysis of Rhamnolipids from Novel Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J

Surfact Deterg. DOI 10.1007/s11743-013-1462-4. Received: 4 November 2012 / Accepted: 11 February 2013. AOCs 2013.

RODRÍGUEZ, Francisco. Biotecnología ambiental. Editorial Tebar, 2005.

RASBAND, W. ImageJ 1.41o (<http://imagej.nih.gov/ij>). National Institutes of Health, USA. 2013.

RUDDEN, M., TSAUOSI, K., MARCHANT, R. *et al.* Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the quantitative determination of rhamnolipid congeners. Applied microbiology and biotechnology, 2015, vol. 99, no 21, p. 9177-9187.

SÁNCHEZ, M. “Propiedades bioquímicas y biofísicas de ramnolípidos biotensioactivos”. Asesor: Antonio Ortuz López. Tesis grado de Doctor. Universidad de Murcia, Murcia. 2010.

SCHENK, T., SCHUPHAN, I. and SCHMIDT, B. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Chromatography A. 1995. Vol. 693(1), 7-13.

SIEGMUND, I. and WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotechnology Techniques. 1991. Vol. 5 n° 4, p. 265-268.

STEEN, Hanno and MANN, Matthias. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nature reviews Molecular cell biology, 2004, vol. 5, no 9, p. 699-711.

SMYTH, T., RUDDEN, M., TSAUOSI, K *et al.* Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids. Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, Springer Protocols Handbooks. 2014. <doi 10.1007/8623_2014_25>.

STOLL, Aurelién. “Impactos Petroleros en Territorios Indígenas: Experiencias del Programa de Vigilancia Territorial del río Corrientes”. Feconaco y Shinai. 1ra ed. Iquitos, 2011.

TABUCHI YAGUI, Takeshi Ricardo. “Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de ramnolípidos”. Asesora: Susana Gutiérrez. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología, UNMSM, Lima, 2014.

TABUCHI, T., MARTÍNEZ, D., HOSPINAL, M. *et al.* Optimización y modificación del método para la detección de ramnolípidos. Revista Peruana de Biología, 2015, vol. 22, no 2, p. 247-258.

TAVARES, L. F. D., SILVA, P. M., JUNQUEIRA, M. *et al.* Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. Applied microbiology and biotechnology, 2013, vol. 97, no 5, p. 1909-1921.

TREJO, J. A. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología, 2002.

VAN DYKE, M.I., COUTURE, P., BRAUER, M., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 1993. Vol. 39(11), pp. 1071-1078.

WANG, Q., FANG, X., BAI, B. *et al.* Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007. Vol. 98, n° 4, p. 842-853.

WILLUMSEN, P.A. and KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 1997. Vol. 7, pp. 415-423.

YIN, Xihou. Formulations combining ramoplanin and rhamnolipids for combating bacterial infection. U.S. Patent Application No 14/201,633, 7 Mar. 2014.

ZHANG, G.L. *et al.* Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*. 2005. Vol. 6B n° 8, p.725-730.

ZHANG, Y. and MILLER, R.M.. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*. 1992. Vol. 58(10), p. 3276–3282.

X. ANEXOS

10.1 Anexo 1. Detalle de Halos revelados de cada combinación.

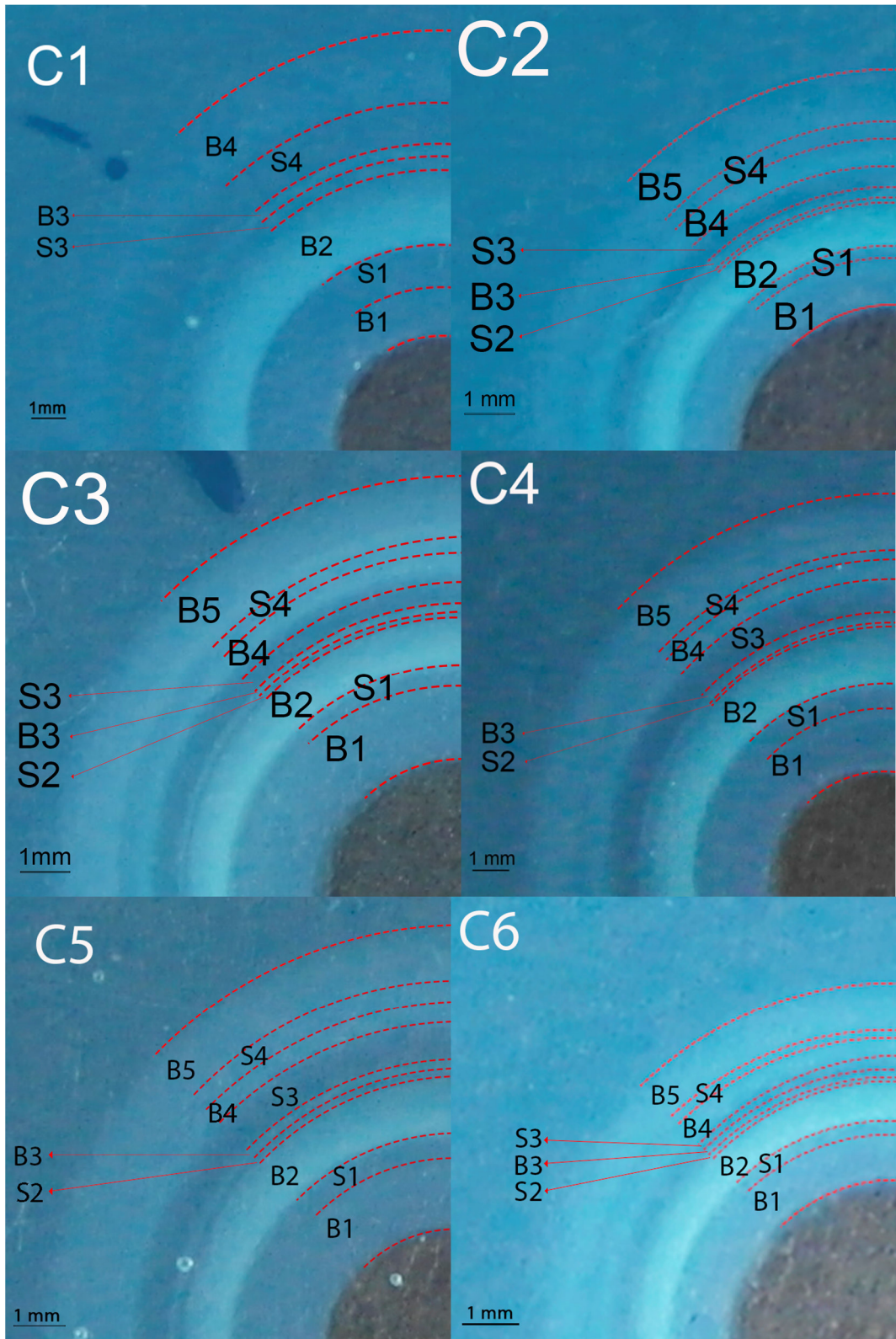


Figura 34. Detalle de halos revelados desde la combinación 1 (C1) hasta la combinación 6 (C6).

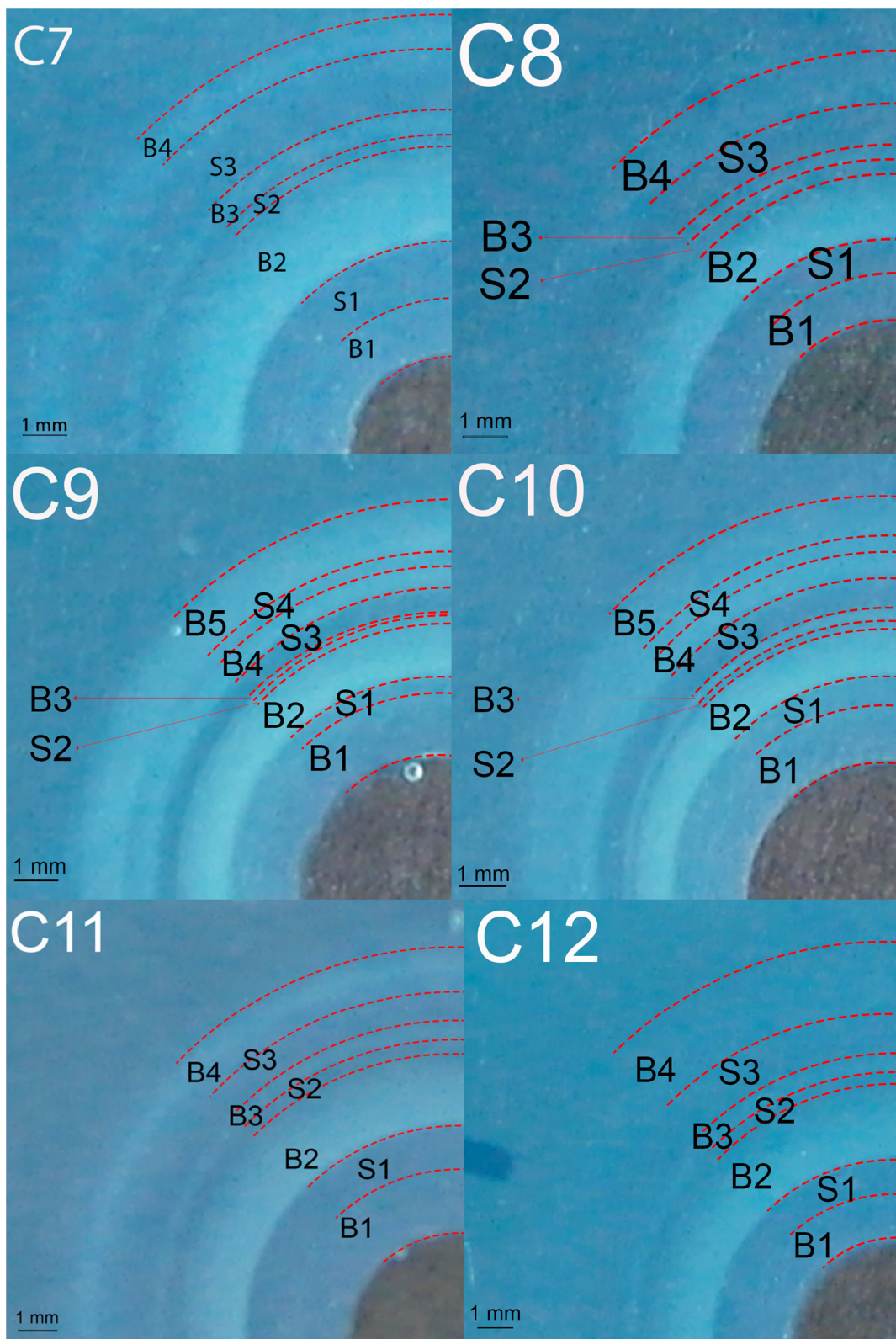


Figura 35. Detalle de halos revelados desde la combinación 7 (C7) hasta la combinación 12 (C12).

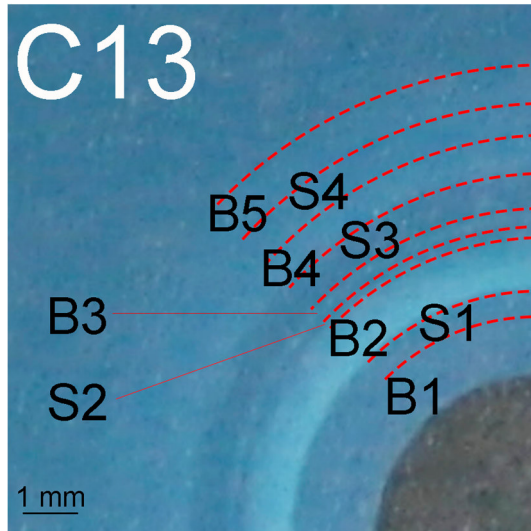


Figura 36. Detalle de halos revelados de la combinación 13 (C13)

10.2 Anexo 2. Espectros de masas y diagramas de fragmentación de los RL detectados en la muestra RL 6K-11

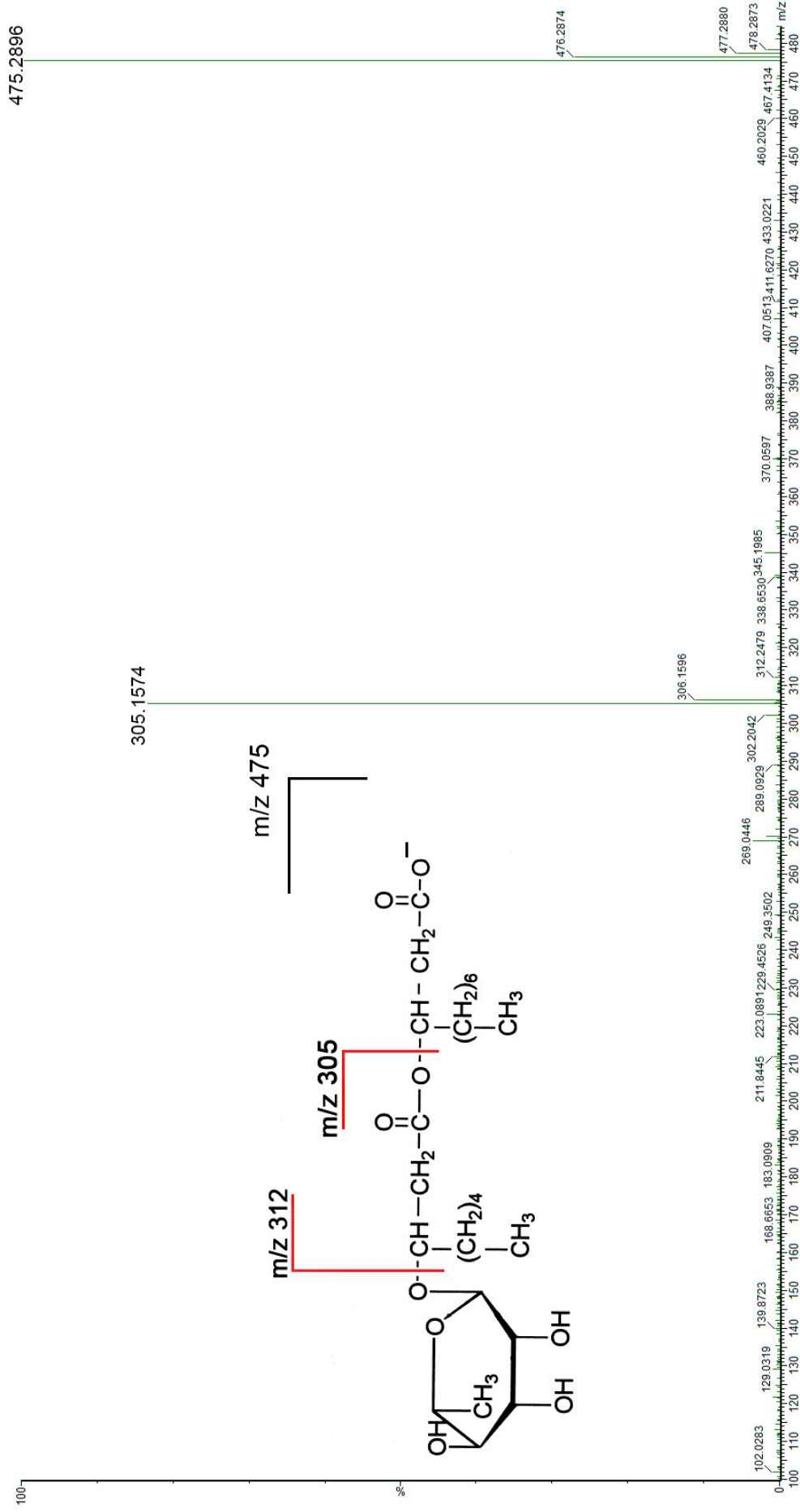


Figura 37. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C₈-C₁₀ producido por *P. aeruginosa* 6K-11

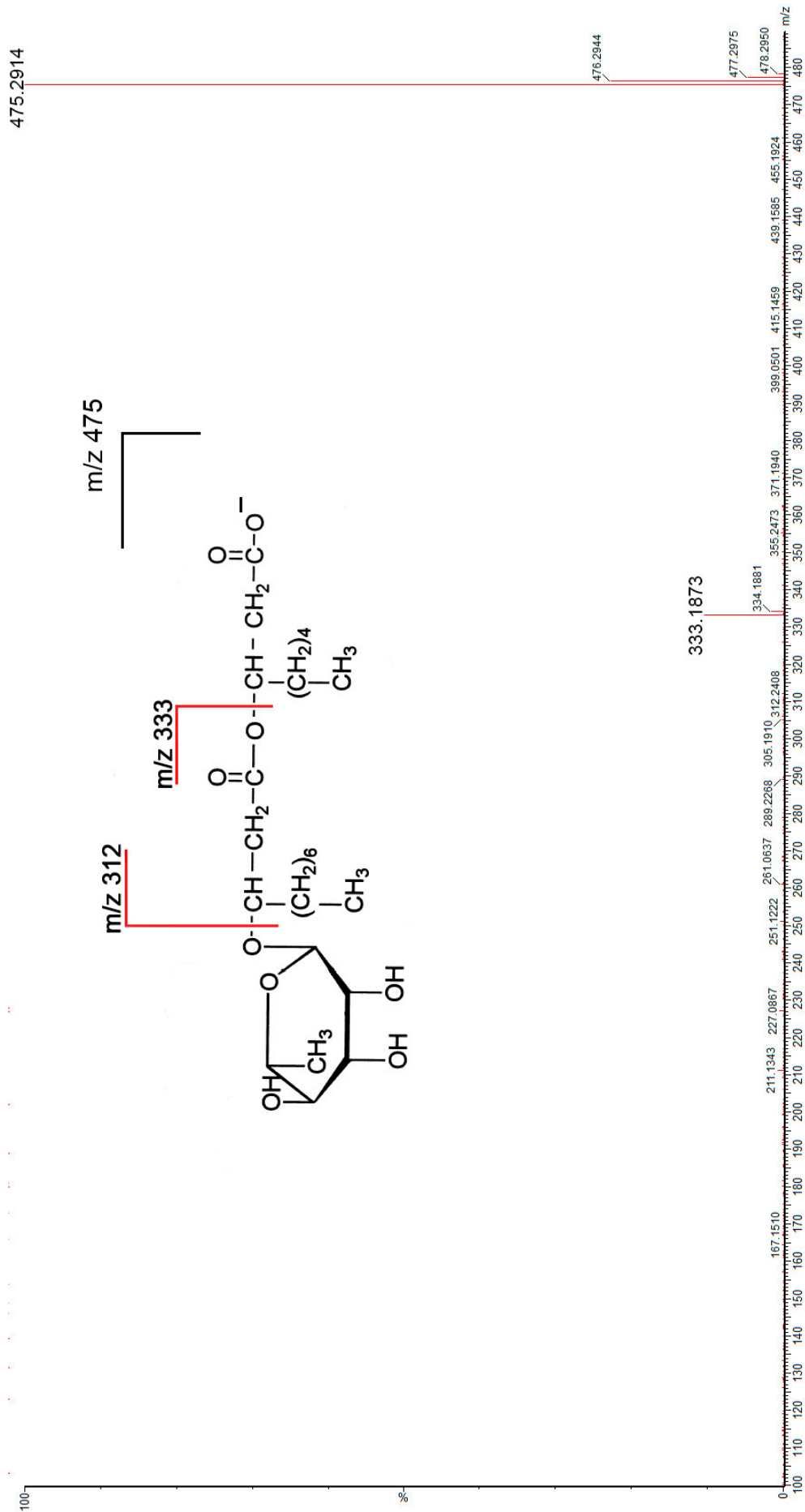


Figura 38. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C₁₀-C₈ producido por *P. aeruginosa* 6K-11

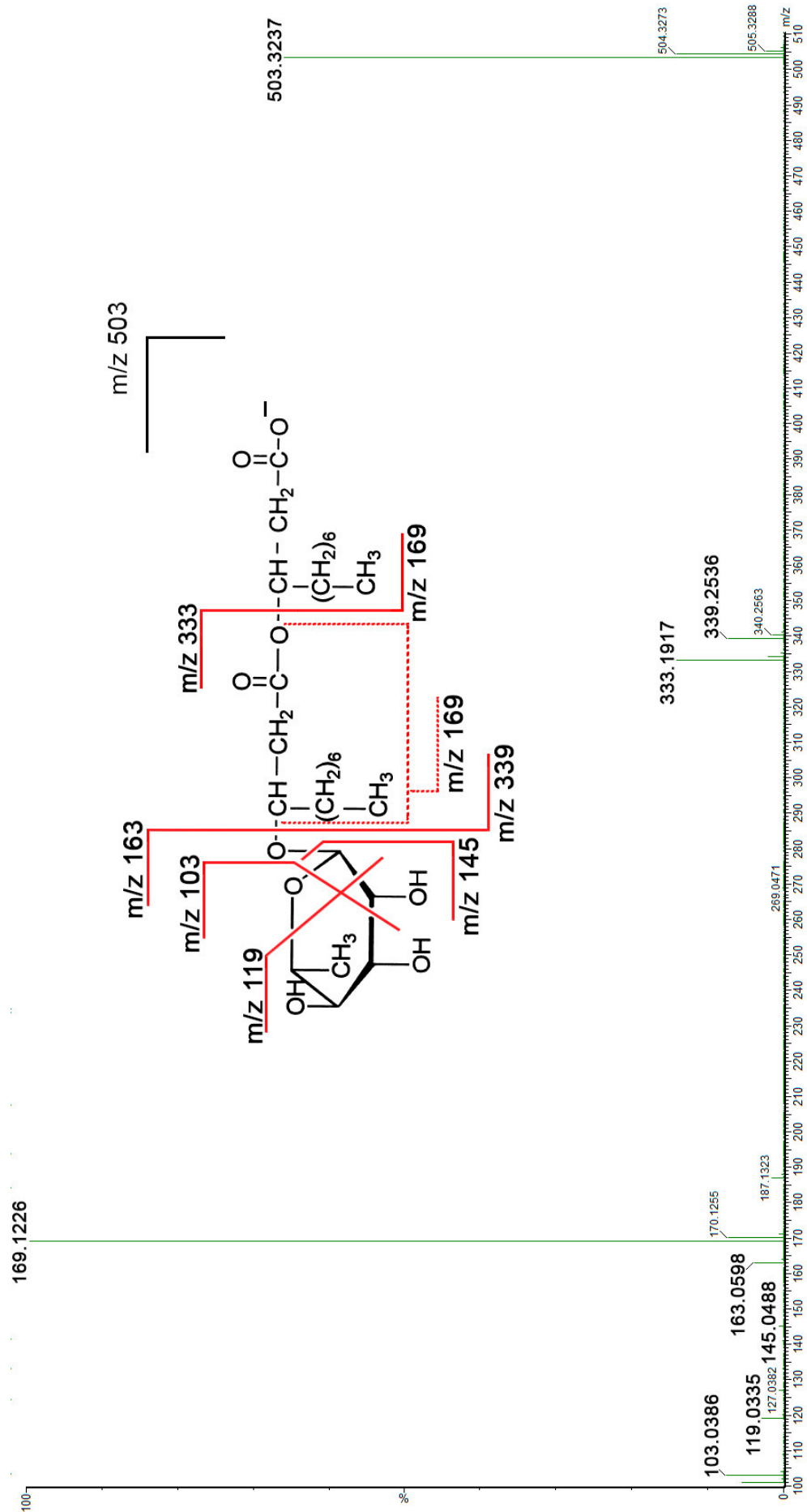


Figura 39. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C₁₀-C₁₀ producido por *P. aeruginosa* 6K-11

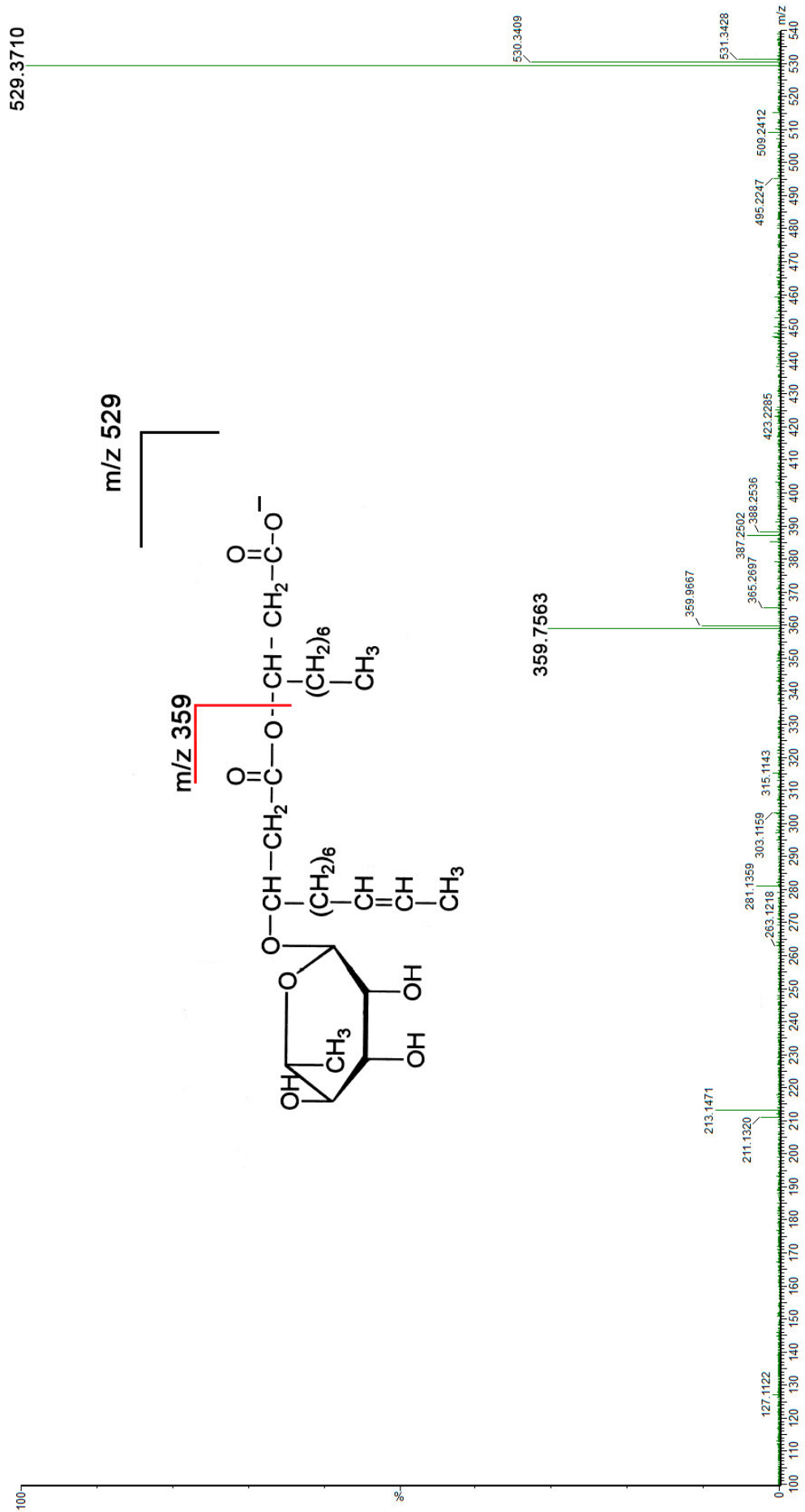


Figura 41. Espectro de masas MS/MS del mono-RL Rha-C_{12:1}-C₁₀ producido por *P. aeruginosa* 6K-11

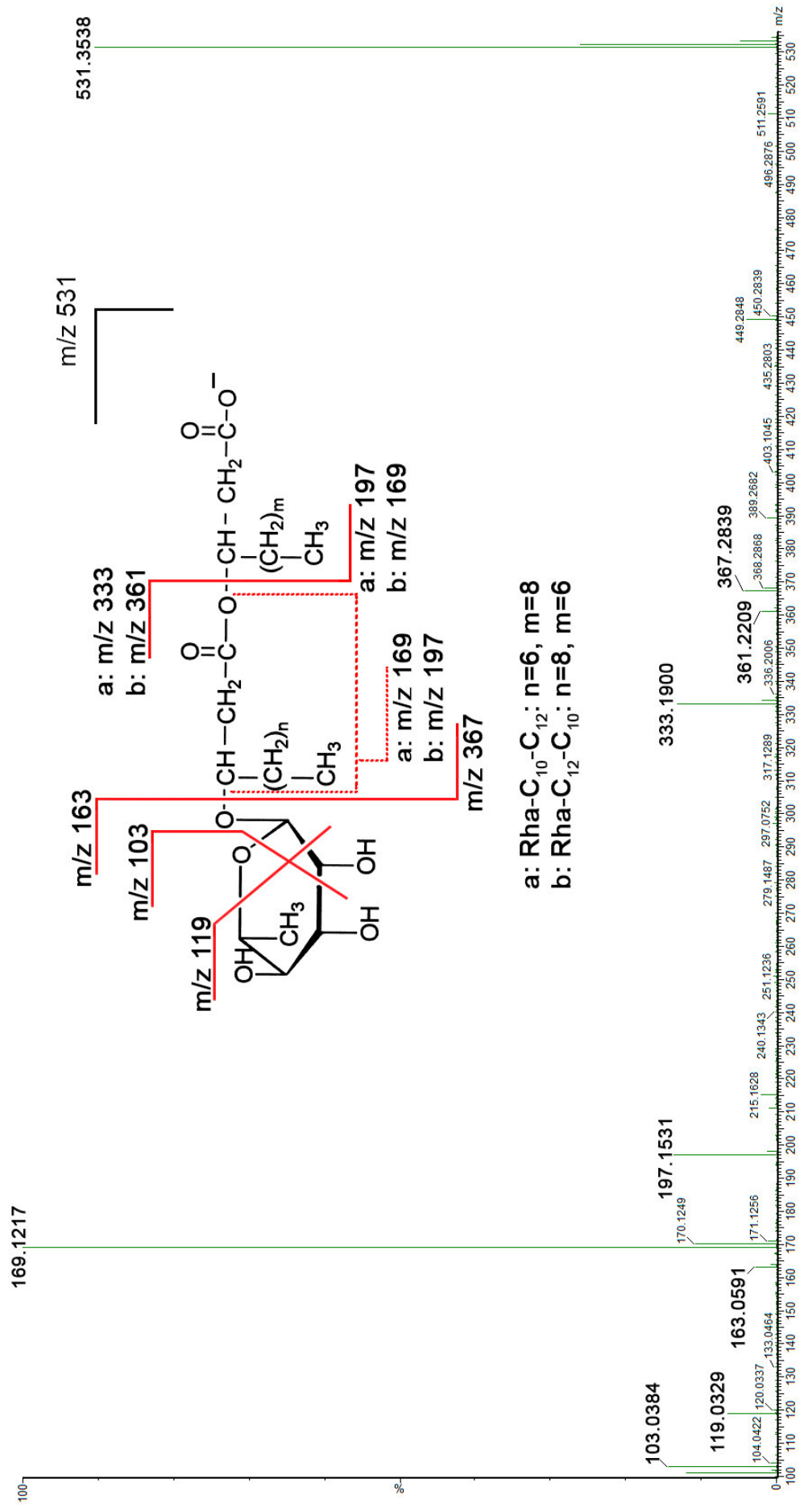


Figura 42. Espectro de masas MS/MS de los mono-FL Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-C₁₂-C₁₀ producidos por *P. aeruginosa* 6K-11

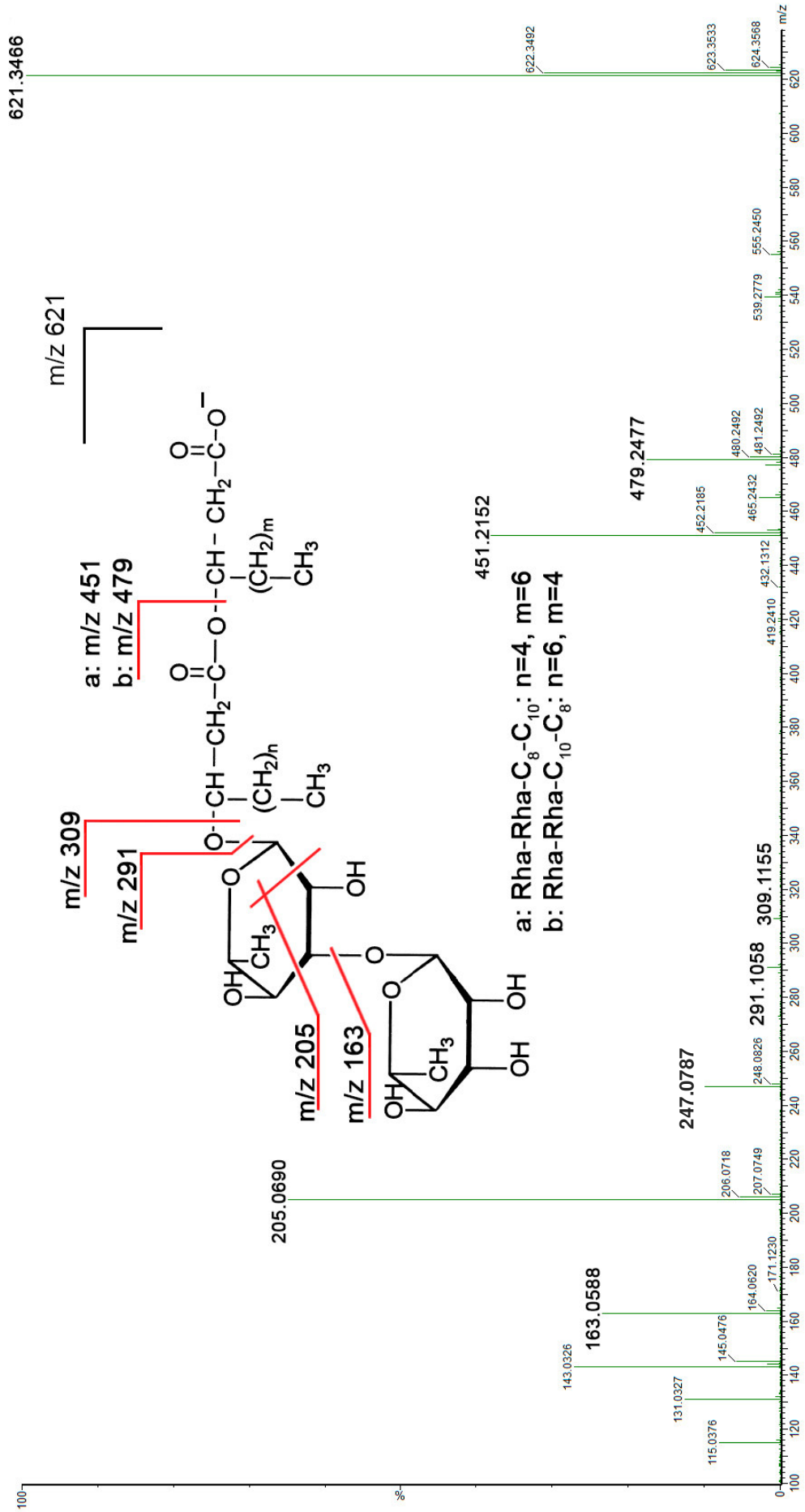


Figura 43. Espectro de masas MS/MS de los di-RL Rha-Rha-C8-C10 y Rha-Rha-C10-C8 producidos por *P. aeruginosa* 6K-11

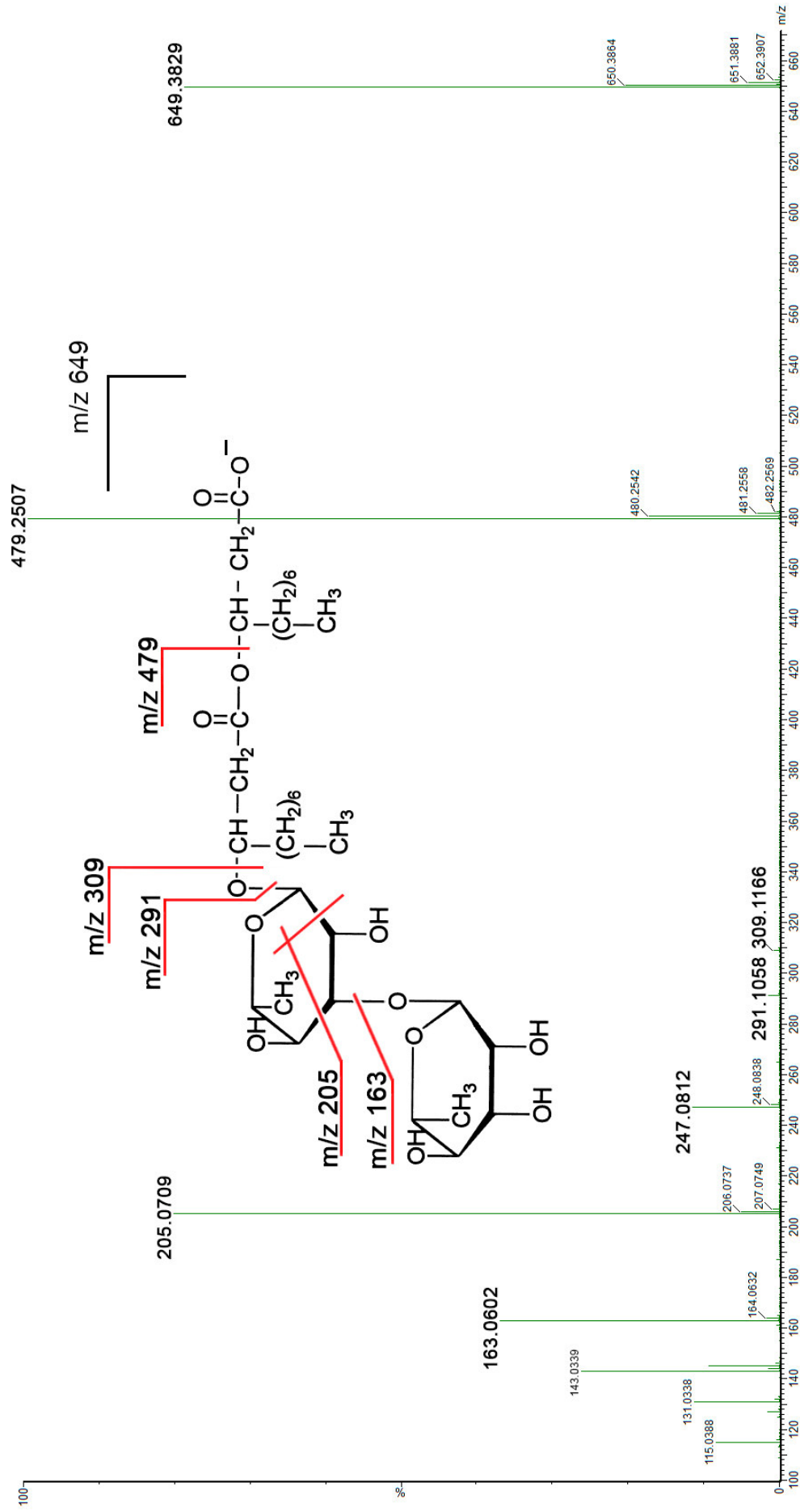


Figura 44. Espectro de masas MS/MS del di-RL Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ producido por *P. aeruginosa* 6K-11

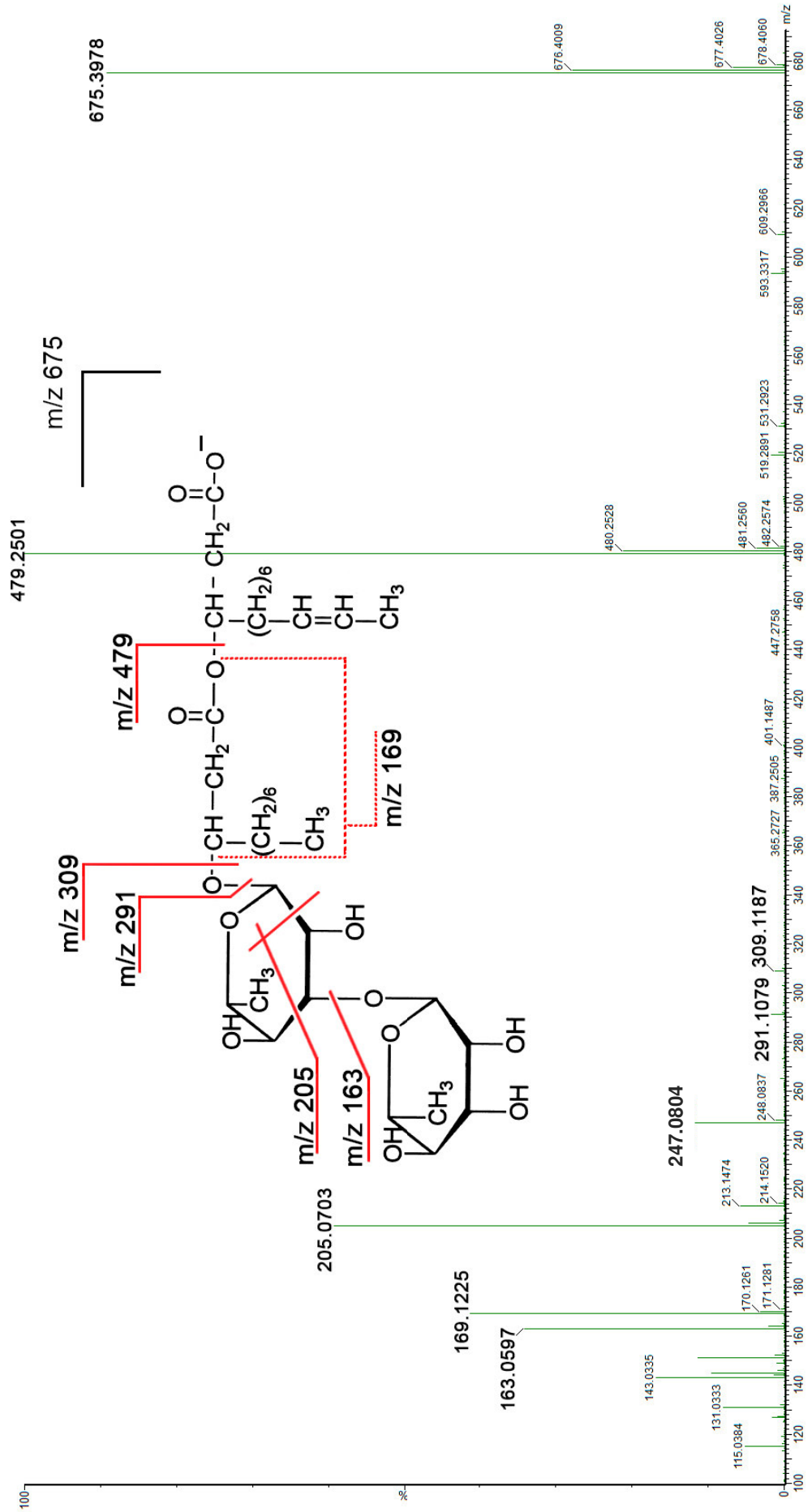


Figura 45. Espectro de masas MS/MS del di-RL Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1} producido por *P. aeruginosa* 6K-11

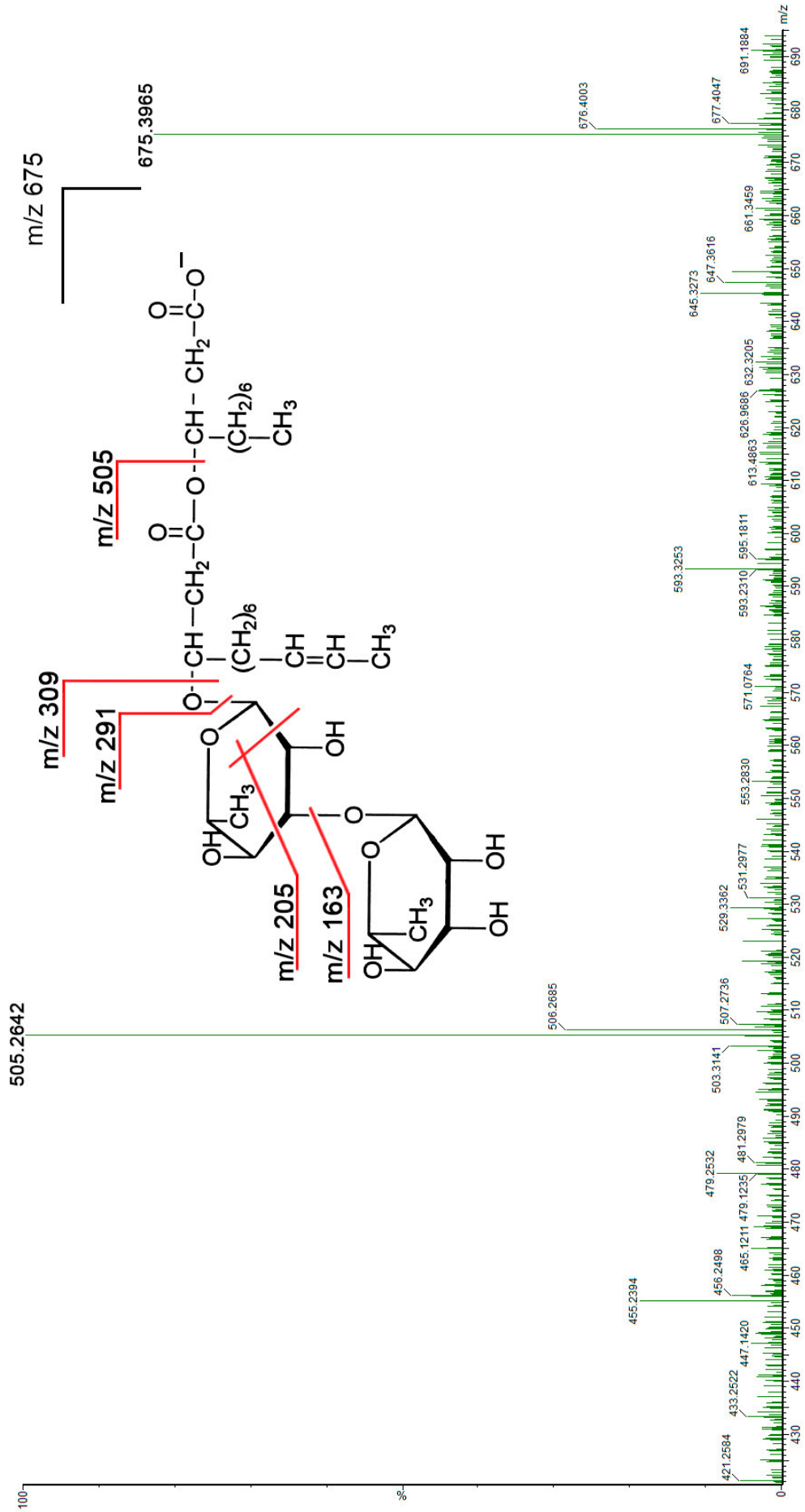


Figura 46. Detalle del espectro de masas MS/MS del di-RL Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₀ producido por *P. aeruginosa* 6K-11

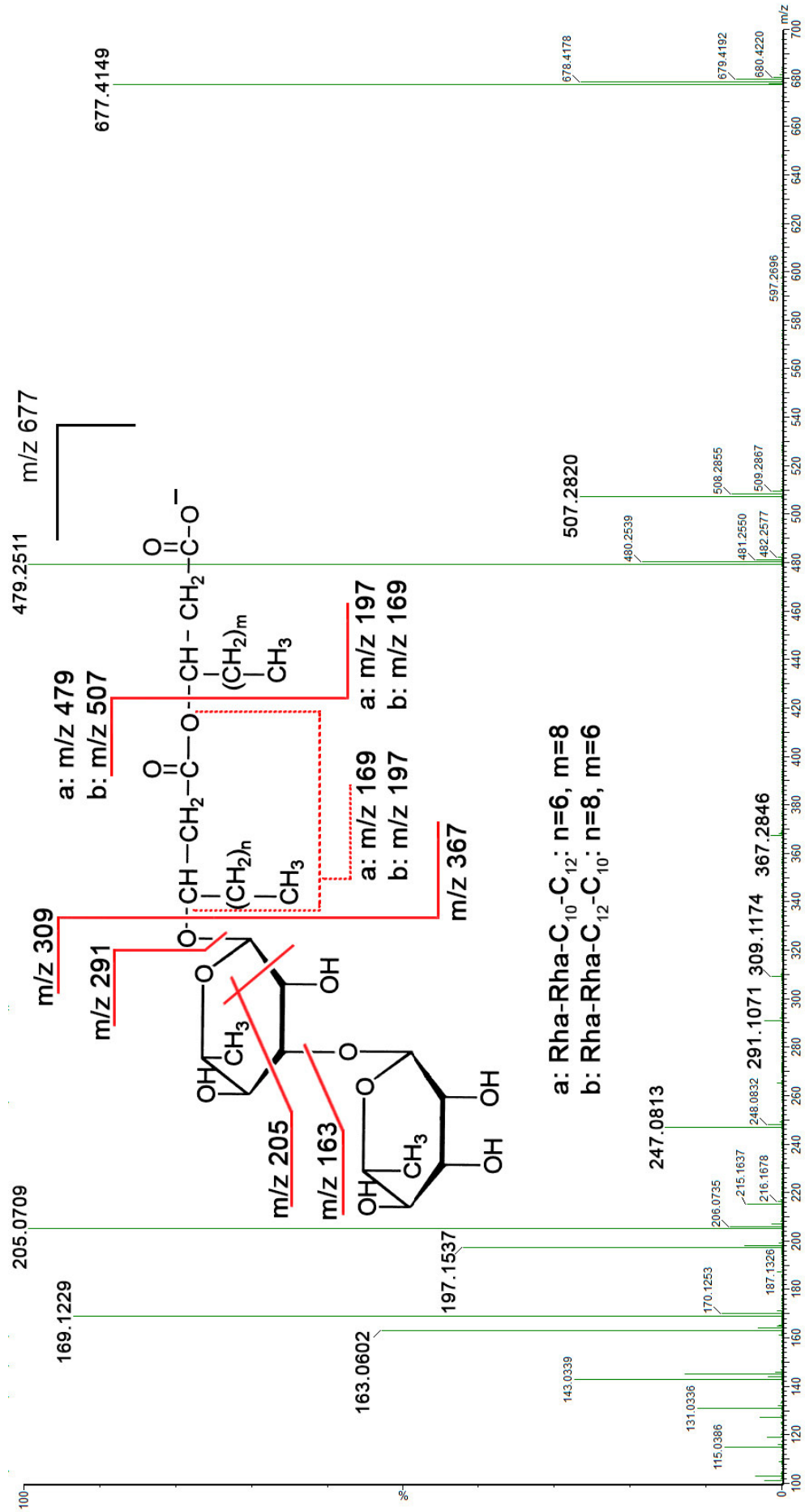


Figura 47. Espectro de masas MS/MS de los di-RL Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ y Rha-Rha-C₁₂-C₁₀ producidos por *P. aeruginosa* 6K-11