



**UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica De Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMEDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Estudio químico y actividad biológica del hongo *Laccaria laccata* Scop.  
Cooke, en la región Sur del Ecuador.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** De La Torre Tacuri, Carla Estefanía

**DIRECTOR:** Andrade Morocho, José Miguel, M. Sc.

**LOJA- ECUADOR**

**2017**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2017

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister

José Miguel Andrade Morocho.

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Estudio químico y actividad biológica del hongo *Laccaria laccata* Scop. Cooke, en la región Sur del Ecuador**, por De La Torre Tacuri Carla Estefanía ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2017

f). .....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo De La Torre Tacuri Carla Estefanía declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Estudio químico y actividad biológica del hongo *Laccaria laccata* Scop. Cooke, en la región Sur del Ecuador, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el M.Sc. Andrade Morocho José Miguel director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....  
Autora: De La Torre Tacuri Carla Estefanía  
Cédula. 1104934516

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida, caminando de mi mano todo este tiempo y guiándome en cada paso y decisión tomada.

A mi hermana Andrea Tacuri por darme su apoyo incondicional durante esta larga etapa de mi vida alentándome siempre sin importar las circunstancias.

A mi madre Sonia Tacuri ya que sin su esfuerzo y trabajo diario no hubiera sido posible todo esto, su amor y valentía me enseñaron que todo es posible si le pones corazón a lo que amas.

A mi familia y amigas que siempre creyeron en mí y en mis capacidades.

Carla Estefanía De La Torre Tacuri

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por darme sabiduría para lograr con éxito mis metas, y por nunca permitir que me rinda durante toda mi carrera universitaria. Su amor incondicional me ha motivado y me ha levantado cada día, en momentos de angustia siempre estuvo para mí guiándome y enseñándome que no importa cuántas veces me caiga el siempre estará ahí para sostener mi mano levantarme y empezar de nuevo.

A mi familia quienes siempre me brindaron su apoyo y consejos.

A mi hermana por brindarme su confianza y creer siempre en mis capacidades alentándome cada día a luchar por mis sueños, a mi madre a quien agradezco el haberme permitido culminar mi carrera universitaria ya que sin su esfuerzo y trabajo duro no hubiera sido posible.

A mis amigas quienes me han enseñado que la amistad verdadera existe y que hermanos no solo son los de sangre.

A mi director de tesis M. Sc. José Miguel Andrade por brindarme su tiempo, conocimientos y su amistad.

Al Ph. D. Vladimir Morocho por brindarme su ayuda incondicional siempre, por su amistad, entrega y tiempo compartido y por sus valiosos conocimientos que me enseñaron a realizar mejor mi trabajo.

Carla Estefanía De La Torre Tacuri

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCION .....	3
CAPÍTULO 1 .....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
1.1    Reseña Histórica .....	5
1.2    Biodiversidad de los hongos en el Ecuador .....	5
1.3    Reino fungi .....	6
1.3.1    Hongos.....	6
1.3.2    Basidiomicetos.....	7
1.4    Familia Hydnangiaceae .....	8
1.5    Descripción del género <i>Laccaria</i> .....	8
1.6    Descripción de la especie <i>Laccaria laccata</i> Scop. Cooke .....	8
1.6.1    Clasificación taxonómica de la especie <i>Laccaria laccata</i> .....	9
<b>1.7    Metabolitos secundarios de basidiomicetos .....</b>	<b>9</b>
1.7.1    Polisacáridos.....	10
1.7.2    Diterpenos.....	10
1.7.3    Terpenos.....	10
1.7.4    Alcaloides.....	11
1.7.5    Ácidos Grasos.....	11
1.7.6    Esteroles.....	11
<b>1.8    Técnicas de separación, purificación e identificación de metabolitos secundarios .....</b>	<b>12</b>
1.8.1    Maceración.....	12
1.8.2    Cromatografía de Columna (CC).....	12
1.8.3    Cromatografía de pared delgada .....	13
1.8.4    Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).....	13

1.8.5	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	13
<b>1.9</b>	<b>Actividad biológica.....</b>	<b>13</b>
1.9.1	Bacterias gram positivas.....	14
1.9.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.9.1.2	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	14
1.9.1.3	<i>Micrococcus luteus</i> .....	14
1.9.2	Bacterias Gram Negativas.....	15
1.9.2.1	<i>Echerichia coli</i> .....	15
1.9.3	Levaduras.....	15
1.9.3.1	<i>Candida albicans</i> .....	15
<b>1.10</b>	<b>Enzima <math>\alpha</math>-Glucosidasa.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>.....</b>	<b>17</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>.....</b>	<b>17</b>
2.1	Metodología Empleada.....	18
2.2	Recolección y selección de los basidiocarpos.....	18
2.3	Obtención de extractos totales.....	19
2.4	Cromatografía de capa fina (CCF).....	19
<b>2.5</b>	<b>Fraccionamiento del extracto Acetato de Etilo.....</b>	<b>19</b>
2.6	Purificación de los compuestos.....	20
2.6.1	Fracción LLaC1.....	20
<b>2.7</b>	<b>Fraccionamiento del extracto de Etanol.....</b>	<b>21</b>
2.7.1	Fracción Fle 6-8.....	22
2.8	Fraccionamiento del extracto de Etanol.....	23
2.9	Caracterización de compuestos purificados.....	24
2.9.1	Resonancia Magnética Nuclear.....	24
2.9.2	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).....	24
<b>2.10</b>	<b>Actividad biológica de los extractos.....</b>	<b>26</b>
2.10.1	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	26
2.10.2	Microorganismos de prueba.....	26
2.10.3	Preparación de la muestra.....	26
2.10.4	Preparación del cultivo overnight.....	26
2.10.5	Preparación de la suspensión del inóculo para microorganismos.....	27
2.10.5.1	<i>Inóculo para bacterias</i> .....	27
2.10.5.2	<i>Inóculo para levaduras</i> .....	27
<b>2.11</b>	<b>Concentración mínima inhibitoria (CMI).....</b>	<b>27</b>



2.11.1	Concentración Mínima Inhibitoria Antimicrobiana. ....	27
<b>2.12</b>	<b>Actividad enzimática</b> .....	<b>28</b>
2.12.1	Ensayo de $\alpha$ -glucosidasa.....	28
<b>CAPITULO 3</b>	.....	<b>30</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	.....	<b>30</b>
3.1	Extractos obtenidos de <i>Laccaria laccata</i> .....	31
3.2	Compuestos aislados de <i>Laccaria laccata</i> .....	31
<b>3.3</b>	<b>Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo</b> .....	<b>32</b>
3.3.1	Compuesto 1. ....	32
<b>3.4</b>	<b>Fraccionamiento del extracto de Etanol</b> .....	<b>33</b>
3.4.1	Compuesto 2. ....	33
3.4.2	Compuesto 3. ....	35
3.4.3	Compuesto 4. ....	36
3.4.4	Compuesto 5. ....	38
<b>3.5</b>	<b>Determinación de la actividad biológica de los extractos</b> .....	<b>39</b>
3.5.1	Actividad antimicrobiana.....	39
3.5.2	Actividad enzimática de los extractos totales.....	40
<b>CAPITULO 4.</b>	.....	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	.....	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	<b>42</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	.....	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	<b>44</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diversidad del Reino Fungi. ....	6
<b>Figura 2.</b> Esquema metodológico de la investigación.....	18
<b>Figura 3.</b> <i>Laccaria laccata</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Obtención de los extractos totales: a) Maceración, b) Concentración, c) Extractos totales.....	19
<b>Figura 5.</b> CCF de las fracciones (1-10) eluidas en Hex/AcOEt (9:1).....	20
<b>Figura 6.</b> CCF de la fracción HLLaC3 eluída en Hex/AcOEt (9:1). ....	21
<b>Figura 7.</b> CCF de las fracciones obtenidas eluidas en Hex/AcOEt (3:2): a) Luz UV 254nm, b) Luz UV 365nm, c) Placa revelada.....	21
<b>Figura 8.</b> CCF de la fracción (5-6), eluída en Hex/AcOEt (3:2).....	23
<b>Figura 9.</b> CCF de la fracción (9-10), eluída en Hex/AcOEt (3:2).....	23
<b>Figura 10.</b> CCF de las fracciones 22 y 55, eluidas en (MeOH/H <sub>2</sub> O 95:05).....	24
<b>Figura 11.</b> Estructura química del Ácido oleico metil éster .....	32
<b>Figura 12.</b> Estructura química del Ergosterol.....	33
<b>Figura 13.</b> Estructura química del Peróxido de Ergosterol.....	35
<b>Figura 14.</b> Estructura química del Ácido oleico.....	36
<b>Figura 15.</b> Estructura química del Ácido linoleico metil éster.....	38

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la especie <i>Laccaria laccata</i> .....	9
<b>Tabla 2.</b> Fracciones obtenidas del extracto de Acetato de Etilo y sus pesos respectivos. .....	20
<b>Tabla 3.</b> Fracciones obtenidas del extracto de Etanol y sus pesos respectivos. ....	22
<b>Tabla 4.</b> Características de la Columna Capilar .....	25
<b>Tabla 5.</b> Parámetros operacionales del CG-EM de la columna DB-5MS. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de incubación y medios de cultivo. ....	26
<b>Tabla 7.</b> Peso y rendimiento del extracto de AcOEt.....	31
<b>Tabla 8.</b> Compuestos aislados de <i>L. laccata</i> . ....	31
<b>Tabla 9.</b> Comparación de <sup>1</sup> H NMR del Ácido oleico metil éster.....	32
<b>Tabla 10.</b> Comparación de <sup>1</sup> H NMR del Ergosterol.....	34
<b>Tabla 11.</b> Comparación de <sup>1</sup> H NMR del Peróxido de Ergosterol. ....	35
<b>Tabla 12.</b> Comparación de <sup>1</sup> H NMR del Ácido oleico. ....	37
<b>Tabla 13.</b> Comparación de <sup>1</sup> H NMR del Ácido linoleico metil éster. ....	38
<b>Tabla 14.</b> CMI antibacteriana de los extractos totales obtenidos de <i>L. laccata</i> .....	39
<b>Tabla 15.</b> Efecto inhibidor de $\alpha$ -glucosidasa en extractos totales de <i>L. laccata</i> .....	40

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Ácido oleico metil éster ( $^1\text{H}$ , 400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	53
<b>Anexo 2.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Ergosterol ( $^1\text{H}$ , 400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	54
<b>Anexo 3.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Peróxido de Ergosterol ( $^1\text{H}$ , 400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	55
<b>Anexo 4.</b> Espectros de RMN y CG-EM del Ácido oleico .....	56
<b>Anexo 5.</b> Espectros de RMN y CG-EM del Ácido linoleico etil éster .....	58

## RESUMEN

En esta investigación se aisló e identificó metabolitos secundarios de los extractos de acetato de etilo y etanol del hongo *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, conocido como pimpinela rosada. Mediante técnicas espectroscópicas RMN y CG-EM y datos reportados en literatura se identificaron 5 compuestos conocidos como: ácido oleico metil éster (1), ergosterol (2), peróxido de ergosterol (3), ácido oleico (4) y ácido linoleico etil éster (5). La actividad antimicrobiana se determinó mediante concentración mínima inhibitoria (CMI). Los extractos de acetato de etilo y etanol fueron inactivos frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas. La actividad enzimática de los extractos se evaluó por la capacidad inhibitoria en  $\alpha$ -glucosidasa. El extracto de etanol no mostró actividad inhibitoria sobre la enzima, mientras que el extracto de Acetato de etilo exhibió una fuerte actividad con un valor  $IC_{50}$  de 24,17  $\mu$ g/mL.

**Palabras claves:** *Laccaria laccata*,  $\alpha$ -glucosidasa, CMI.

## ABSTRACT

In this research, secondary metabolites of the ethyl acetate and ethanol extracts of the fungus *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, known as pink pimpernel, were isolated and identified. By means of NMR and GC-MS spectroscopic techniques and data reported in the literature, 5 known compounds were identified: oleic acid methyl ester (1), ergosterol (2), ergosterol peroxide (3), oleic acid (4) and linoleic acid ethyl ester (5). The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC). The extracts of ethyl acetate and ethanol were inactive against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The enzymatic activity of the extracts was evaluated by the inhibitory capacity in  $\alpha$ -glucosidase. The ethanol extract showed no inhibitory activity on the enzyme, whereas the Ethyl Acetate extract exhibited strong activity with an IC 50 value of 24.17  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

**Keywords:** *Laccaria laccata*,  $\alpha$ -glucosidase, CMI.

## INTRODUCCION

El reino fungi posee una amplia diversidad biológica y cuenta con un aproximado de 1,5 millones de especies que se diferencian unas de otras por su ciclo de vida y morfología variables (Aguirre-Acosta, Ulloa, Aguilar, Cifuentes & Valenzuela, 2014). Los hongos al poseer características fenotípicas variables que permiten identificarlos macroscópica y microscópicamente a nivel morfológico posibilitan su clasificación en las diferentes categorías del reino fungi (Montes, Respetro & McEwen, 2003).

Los hongos son alimentos nutricionales y funcionales, así como una importante fuente de medicamentos fisiológicamente beneficiosos. Ellos producen una gran variedad de metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas y actividades biológicas interesantes y por lo tanto, tienen el potencial de ser valiosos recursos químicos (Kim *et al.*, 2013). Para el Ecuador se estima una riqueza aproximada de 100000 especies de macrohongos, de las cuales han sido registradas únicamente 3766 de un total de 10570 especímenes recolectados que en su mayoría solo han sido clasificadas a nivel de género (Andrade, Malagón, Piepenbring, & Armijos, 2012), estos datos refleja la escasa investigación en el campo de los macrohongos.

*Laccaria*, es un hongo comestible con una amplia distribución en la mayor parte de china, especialmente al suroeste de china, fácilmente definido por sus láminas anchas, gruesas, adnadas e incluso decurrentes, por su color de variables matices, de rosa cárneo y de violáceo más o menos intenso, de esporas esferoideas, elipsoides y verrugosas, micelio a veces coloreado de violeta y vida fundamentalmente saprofitica (Liu, Zhou, Jiang, Wang & Liu, 2010).

*Laccaria laccata* perteneciente a la familia Hydnangiaceae, es una especie distintiva con respecto a otros géneros. Los estudios químicos de este género reportan la presencia de ácidos grasos, ésteres, esteroides, y triterpenos los mismos que poseen relevancia farmacológica con acciones comprobadas antitumorales y antivirales (Rivera, Nieto, & Valencia, 2012).

En Ecuador no se ha registrado ningún estudio químico de las especies de la familia Hydnangiaceae, por lo cual la finalidad del proyecto se enfocó principalmente en la caracterización de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad biológica del hongo *L. laccata* recolectado en la región sur del Ecuador, la cual aportaría a la identificación de nuevos posibles compuestos químicos con actividad farmacológica.

**CAPÍTULO 1**  
**MARCO TEÓRICO**



## **1.1 Reseña Histórica**

La primera y la más importante utilidad que el hombre ha atribuido a los recursos fúngicos existentes en su entorno ecológico es el de la obtención de alimentos. Gracias al conocimiento tradicional generado a través de los años, los hongos superiores se han venido integrando a nuestra dieta en sus formas silvestres, y actualmente algunos de ellos ya son cultivados y comercializados en algunos mercados regionales y a nivel mundial (Rendon, 2015).

Los hongos se cuentan entre los organismos más importantes del mundo, no solamente por su papel vital en el funcionamiento del ecosistema, sino también por su influencia en los humanos y en actividades relacionadas con él. También son esenciales en la descomposición, y transporte de nutrientes de la misma forma son indispensables para el desarrollo sostenible del ambiente. Algunas especies son patógenas de plantas, animales y otras forman simbiosis con diversas especies de plantas, algas, cianobacterias y animales (Urrutia, 2010).

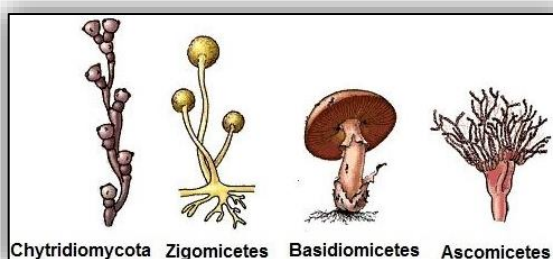
Se sabe que los primeros mexicanos usaban preparaciones derivadas de hongo para acelerar la cicatrización de heridas, es por ello que México se considera un país mega diverso en cuanto a grupos de organismos, ocupando el quinto lugar en el mundo por su gran número de especies y endemismos, contando con el 10% de la diversidad terrestre del planeta (Aguirre-acosta, Ulloa, Aguilar, & Cifuentes, 2014), es a partir de este conocimiento empírico que surge el interés por generar conocimiento de la actividad biológica de estos organismos (Quiriz, 2012).

## **1.2 Biodiversidad de los hongos en el Ecuador**

Ecuador es considerado uno de los países más biodiversos del mundo con ecosistemas frágiles que comprenden una gran diversidad biológica como flora, fauna y microbiota. Se estima alrededor de 100000 especies de macrohongos aunque según la bibliografía se conocen aproximadamente 3766 taxones lo que equivale al 4% de hongos estimados en el Ecuador (Perez, 2015), pese a las diferentes especies existentes en el país se conoce una diversidad de no más del 5 % en parte justificada por la escasez de estudios taxonómicos que permiten precisamente conocer esa diversidad. Actualmente nuestro país está iniciando múltiples estudios científicos de hongos, con interés sistemático, ecológico, biotecnológico y químico.

### 1.3 Reino fungi

El reino Fungi representa uno de los más grandes acervos de biodiversidad con actividades ecológicas esenciales en todos los ecosistemas y con una gran variabilidad en morfología y ciclos de vida (Aguirre-acosta *et al.*, 2014). Entre los organismos que lo conforman predominan los Hongos, mohos y las levaduras, los mismos que se clasifican en un reino biológico distinto al de las plantas, animales y protistas (Díaz, 2015). Se estima que dentro de este reino pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies (Ponton, Moragues, Gene, Guarro, & Quindos, 2002). Debido a los nuevos avances tecnológicos, la taxonomía del reino fungi está en constante cambio, por las clasificaciones a través de pruebas bioquímicas, genéticas y de biología molecular, la mayoría de autores reconocen principalmente las divisiones *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Chytridiomycota*, (Figura 1) (Prada & Vega, 2008).



**Figura 1.** Diversidad del Reino Fungi.

**Fuente:** Prada & Vega, 2008.

**Elaboracion:** Prada & Vega, 2008.

#### 1.3.1 Hongos.

Los hongos se encuentran clasificados en el Reino Fungi constituyendo un grupo muy numeroso de organismos eucariotas en el cual existen al menos 1,5 millones de especies, pero probablemente hasta 3 a 5 millones, se cuentan entre los organismos más importantes del mundo debido principalmente a su papel vital en el funcionamiento del ecosistema y al sin número de propiedades tanto medicinales como vitales que representan para el ser humano (Liébana, 2002; Heilmann-clausen *et al.*, 2014).

Son organismos descomponedores con un nivel de organización unicelular, pluricelular o dimórfico, carecen de clorofila y su cuerpo vegetativo, recibe el nombre de talo al estar constituido por filamentos o hifas cuyo nombre se denomina micelio. Sus paredes celulares están constituidas principalmente por quitina, y su división celular puede ser mitótica o

meiótica, en cuanto a su respiración es fundamentalmente aerobia. Los Hongos llevan una nutrición heterótrofa cuya obtención de alimentos es de tipo absorbente, por otro lado su sistema de reproducción puede ser asexual y sexual (Paíno, 2007).

La estructura de las células de los hongos es muy diferente al de las bacterias que son organismos procariotas. Aunque comparten muchas estructuras, las células de los hongos se diferencian de las plantas en la composición de la pared celular y principalmente en que carecen de cloroplastos y clorofila (Pontón, Moragues, Gene, Guarro & Quindos, 2002).

Es importante mencionar que así como la mayoría de estas especies son esenciales para la descomposición, reciclamiento, transporte de nutrientes y desarrollo sostenible del ambiente, algunas de ellas son patógenas de plantas y animales, mientras que otras forman simbiosis. Así mismo diversos productos naturales con importantes propiedades farmacológicas han sido identificados en diferentes especies de hongos y actualmente representan un interés mundial por sus atributos nutricionales, medicinales y por su alto potencial en su contenido de sustancias bioactivas (Urrutia, 2010).

### **1.3.2 Basidiomicetos.**

Dentro de los microorganismos reportados como productores de metabolitos biológicamente activos, los basidiomicetos constituyen una clase de hongos, representada por más de 30 000 especies, cuyo metabolismo y capacidad de producción ha sido apenas investigada (Brizuela, García, & Pérez, 1998).

Una gran mayoría de las especies viven en árboles muertos en pie o en el suelo, sobre ramas caídas, sobre tocones, entre la hojarasca, sobre madera estacionada o en obra, u otros productos maderables. También pueden actuar como verdaderos patógenos, provocando enfermedades en árboles vivos, debilitándolos y matándolos (Popoff & Ferraro, 2002).

Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas. En general, los basidiomicetos presentan la capacidad de producir una gran variedad de moléculas aromáticas tanto en medios naturales como sintéticos. Aunque las bacterias y levaduras ofrecen ventajas considerables con respecto a los hongos en cuanto a facilidades tecnológicas de cultivo y conocimientos biológicos más completos, los basidiomicetos y hongos miceliares en general presentan potencialidades de biosíntesis

más interesantes y numerosas, por lo que resulta conveniente profundizar en el cultivo y manejo de estos microorganismos, con el fin de identificar metabolitos nuevos y útiles al hombre. (Brizuela, García & Pérez, 1998).

#### **1.4 Familia Hydnangiaceae**

La familia Hydnangiaceae abarca 4 géneros *Hydnangium*, *Laccaria*, *Maccagnia* y *Podohydangium*, distribuidos aproximadamente en 30 especies (Matheny *et al.*, 2006). Los hongos de esta familia desempeñan un papel importante como simbioses en los ecosistemas forestales (Popa, Rexer, Donges, Yang, & Kost, 2014).

#### **1.5 Descripción del género *Laccaria***

El género *Laccaria* pertenece a la familia Hydnangiaceae del orden Agaricales, cosmopolita por naturaleza, es un hongo comestible con una amplia distribución en la mayor parte de china, que comprende aproximadamente 30 especies de hongos las cuales se encuentran distribuidas tanto en regiones templadas como tropicales del mundo. Las especies de este género constituyen un modelo experimental importante de la investigación simbiótica ectomicorrízica, pero la información sobre la detección, aislamiento y purificación en este género es relativamente limitada (Yimo, Agi & Inami, 2011), sin embargo los estudios químicos de este género reportan la presencia de ácidos grasos, ésteres y triterpenos los mismos que poseen relevancia farmacológica con acciones tales como antitumorales y antivirales (Rivera, Nieto, & Valencia, 2012).

#### **1.6 Descripción de la especie *Laccaria laccata* Scop. Cooke**

Se la conoce comúnmente como Pimpinela Rosada, su sabor es dulce, se observa un Píleo de 13-55 mm, presenta una variedad de colores entre los que podemos apreciar café rosáceo, amarillo ocre, y café rojizo. Presenta una superficie deprimida o lisa y Basidios tetraspóricos, láminas adnatas o crispadas con dientes regulares, una estirpe de 55-98 x 2-7 mm de color rosado pálido o amarillo crema. La especie *L. laccata* se caracteriza por ser cosmopolita durante todo el año, y por preferir lugares poco sombríos (Paíno, 2007). Es un basidiomiceto que forma asociaciones ectomicorrízicas con una amplia gama de especies arbóreas, muchas de las cuales son de importancia económica (Haselwandter, Ha, Ganzera, Haas, & Nicholson, 2013).

En investigaciones referente a la extracción de principios activos de esta especie se han identificado: ésteres etílicos como 9,12-octadecadienoato de etilo, estearato de etilo, ácidos

grasos, laccaridiones, ergosterol, lanosterol, campesterol, los cuales presentan actividad citotóxica (Nieto & Cucaita, 2008; Berg *et al.*, 2000).

Otros estudios químicos realizados reportan el compuesto éter fenil isopropílico, con efecto citotóxico contra células de riñón de mono, y actividades antibacterianas contra bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus*, bacterias gram negativas *Escherichia coli* y actividad antifúngica contra los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* (Liu, Zhou, Jiang, Wang, & Liu, 2010), por otro lado otras investigaciones detectaron por primera vez la lectina en *L. amethystina* y *L. laccata* (Yimo, Agi & Inami, 2011).

### 1.6.1 Clasificación taxonómica de la especie *Laccaria laccata*.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la especie *Laccaria laccata*

TAXONOMÍA	
<b>Reino</b>	Fungi
<b>División</b>	Basidiomycota
<b>Clase</b>	Agaricomycetes
<b>Orden</b>	Agaricales
<b>Familia</b>	Hydnangiaceae
<b>Género</b>	<i>Laccaria</i>
<b>Especie</b>	<i>laccata</i>
<b>Nombre Científico</b>	<i>Laccaria laccata</i>

**Fuente:** Naranjo, 2014  
**Elaboración:** Naranjo, 2014

## 1.7 Metabolitos secundarios de basidiomicetos

Actualmente se han descrito cerca de un millón de productos naturales aislados a partir de diferentes fuentes, de las cuales los microorganismos constituyen una de las menos estudiadas (Brizuela, García, Pérez & Mansur, 1998), sin embargo los hongos producen una gran variedad de metabolitos secundarios con un amplio interés para el hombre dentro de los cuales encontramos: antibióticos, ciclosporinas, ácidos mevinicos, alcaloides, compuestos antifúngicos, etc (Gutiérrez, Casqueiro, & Martín, 2000).

Los basidiomicetos presentan una capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos apenas investigada. Estos metabolitos son agrupados generalmente acorde a su

naturaleza química, teniendo en cuenta la relación entre ésta y las diferentes actividades biológicas descritas (Brizuela, García, Pérez & Mansur, 1998).

Entre los metabolitos aislados en hongos basidiomicetos se encuentran: polisacáridos, esteroides, ácidos grasos, alcaloides, isoprenoides o terpenos, diterpenos entre otros (Staadén, 2010; Ávila Castañeda, 2009).

### **1.7.1 Polisacáridos.**

Los polisacáridos son polímeros de azúcares (monosacáridos) unidos entre sí por enlaces glucosídicos, pertenecen a una clase estructuralmente diversa de macromoléculas capaces de ofrecer la mayor capacidad para transportar información biológica debido a un alto potencial de variabilidad estructural. Los polisacáridos de los hongos se producen principalmente como glucanos, algunos de los cuales están unidos por enlaces  $\beta$  y  $\alpha$ -glicosídicos. Se ha investigado una amplia gama de polisacáridos antitumorales con diferente estructura química a partir de hongos de Basidiomicetos, y otras investigaciones han comprobado que una variedad de polisacáridos en distintas especies de hongos mejoran el sistema inmunológico. (Daba & O.U.Ezeronye, 2003; Wasser, 2002).

### **1.7.2 Diterpenos.**

Los diterpenos producidos por basidiomicetos poseen una estructura propia hasta ahora encontrada en otras fuentes naturales. Estos compuestos producidos por basidiomicetos presentan múltiples actividades biológicas tales como: antimicrobiana, antifúngica y antibiótica (Brizuela, García, Pérez & Mansur, 1998).

### **1.7.3 Terpenos.**

Los isoprenoides o terpenoides, uno de los grupos más abundantes de compuestos naturales son moléculas esenciales sintetizadas por todos los organismos y la mayor diversidad de estos compuestos se presenta en las plantas. Todos los isoprenoides se derivan de dos unidades básicas, el isopentenil difosfato y su isómero dimetil-alil difosfato (Guevara & León, 2007).

Estos compuestos producidos por basidiomicetos tienen actividad antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antibiótica, citotóxica y mutagénica (Brizuela, García & Pérez, 1998).

#### **1.7.4 Alcaloides.**

Se conocen más de 15.000 metabolitos secundarios producidos por esta familia, sin embargo la más estudiada, debido a sus interesantes propiedades farmacológicas es la de los compuestos quinolinicos; muchos de sus derivados pueden actuar como agentes analgésicos potentes, hipertensores, amebicidas, virucidas, entre otros. Por tal razón, el desarrollo de nuevas rutas sintéticas es objeto de constante de estudio para los químicos orgánicos (Gómez & Kouznetsov, 2005).

#### **1.7.5 Ácidos Grasos.**

Los ácidos grasos son biomoléculas muy importantes para los seres vivos y para la síntesis de la mayor parte de los productos químicos. Los lípidos fúngicos y sus ácidos grasos han sido bien reconocidos ya que de los lípidos de animales, vegetales y microorganismos se han aislado más de cien ácidos grasos distintos. Por lo tanto las distintas especies de hongos son cada vez más importantes en nuestra dieta por sus características nutricionales, organolépticas y farmacológicas (Díez & Álvarez, 2001; Krishna De & Verma, 2011).

#### **1.7.6 Esteroles.**

Son un grupo de lípidos de estructura compleja que se derivan del 1,2-ciclopentano-fenantreno, caracterizados por tener de 27 a 30 átomos de carbono, biológicamente están relacionados con los terpenos de los cuales derivan (Vecka, Žák, & Tvrzická, 2005). Sus principales funciones se asocian a la regulación de la estructura y función de la membrana así como también traducción de señales y lipidación de proteínas (Nes & Zhou, 2009).

Los hongos contienen diferentes esteroles por lo tanto presentan diferentes características fisicoquímicas y actividades biológicas. Los esteroles fúngicos o micosteroles se caracterizan por tener un sustituyente  $3\beta$  hidroxilo, un grupo  $\beta$ -metilo en C-10 y otro en C-13, y una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono en el C-17 (Juarez. L, 2013). Presentan diversas funciones biológicas como antivirales, antitumorales, antiinflamatorias e inmunosupresoras (Kimura *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

## **1.8 Técnicas de separación, purificación e identificación de metabolitos secundarios**

Las técnicas cromatográficas, son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y otra móvil (Volont & Quiroga, 2013).

Para la determinación de metabolitos secundarios presentes en la especie *L. laccata* se aplicó una serie de técnicas para la determinación estructural, desarrollando varios métodos, basados en las extracciones mediante solventes apropiados.

### **1.8.1 Maceración.**

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido que pone en contacto directo el hongo y el solvente, durante varios días. Se trata de una técnica que da como resultado un equilibrio de concentración entre el material vegetal y el solvente, y depende de factores que están unidos al mismo, como por ejemplo, su naturaleza, el tamaño de la partícula, su contenido de humedad y cantidad y factores que están relacionados con el solvente, como la selectividad y la cantidad. Durante la maceración ocurre un fenómeno de gran importancia, que es el hinchamiento del material vegetal, esto dará lugar a un aumento en la permeabilidad de la pared celular, mejorando la difusión del disolvente (Sharapin, 2000).

Existen dos maneras en las que se puede llevar a cabo este proceso, clásica o estática y dinámica. Estos métodos dejan en contacto la materia prima con el solvente. El método dinámico utiliza agitación para homogenizar la mezcla que ayudado por el solvente cubre mejor la materia prima el mismo que puede utilizar calor para obtener un alto rendimiento o reducir su tiempo de extracción (Barrientos, 2016).

### **1.8.2 Cromatografía de Columna (CC).**

Es el método más general para la separación y purificación de compuestos orgánicos, sólidos o líquidos, presenta dos fases: la estacionaria (adsorbente) se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina en un estrechamiento con una llave, y se impregna con una fase móvil (eluyente). La mezcla a separar se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria, y la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos eluidos, disueltos en la fase móvil, salen de la columna y se recogen en fracciones. En fase directa los menos polares, son los primeros en salir. Los polares quedan más retenidos y para su elución generalmente es necesario incrementar la polaridad del disolvente, mientras que en la fase inversa sucede todo lo contrario (Rendon & Torres, 2012).



### **1.8.3 Cromatografía de pared delgada.**

Es una de las técnicas de cuantificación más utilizadas en la separación, identificación y determinación de drogas en su estado puro, su principal uso está enfocado en fines educativos y análisis cualitativos. En la cromatografía de pared delgada, la fase móvil se mueve por capilaridad a través de la fase estacionaria (adsorbente) aplicada como una capa fina y uniforme sobre un soporte inerte (vidrio, plástico, lámina de aluminio), el mecanismo de separación se basa generalmente en un proceso de adsorción, sin embargo, es factible que ocurra un proceso de partición o una combinación de ambos efectos, dependiendo del tipo particular de adsorbente, su preparación y el uso con diferentes fases móviles. Si por ejemplo la fase móvil contiene agua, metanol, u otro solvente muy polar, este líquido puede ser adsorbido desde la fase móvil que está avanzando, convirtiendo así el sistema de adsorción en un sistema cromatográfico de partición que se basa en separar sustancias en la misma fase, o líquidos inmiscibles (Volont & Quiroga, 2013).

### **1.8.4 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).**

La CG es la principal técnica analítica para la separación de compuestos volátiles, por su rápido análisis, resolución, fácil operación y excelentes resultados cuantitativos (Lopez, 2008). En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y requieren poca cantidad de muestra para su análisis, por lo cual son muy compatibles. Los compuestos se ionizan y se clasifican en función de su relación masa/carga (Valcárcel & Cárdenas, 2000).

### **1.8.5 Resonancia magnética nuclear (RMN).**

Es una de las técnicas más poderosas para la elucidación de compuestos moleculares mediante la caracterización de los desplazamientos químicos expresada en unidades delta (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Esta técnica se basa en las propiedades magnéticas que poseen algunos núcleos atómicos para extraer información sobre la estructura química de la muestra (Kind & Fiehn, 2010).

## **1.9 Actividad biológica**

La actividad biológica se refiere a cualquier efecto que ejerce la muestra en estudio sobre los seres vivos. Las bacterias son microorganismos unicelulares capaces de reproducirse mediante fisión binaria, replicando al mismo tiempo su ADN, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, por lo cual se denominan procariotas, y se

distinguen en dos grupos importantes de bacterias las Gram positivas y Gram negativas (Flores & vargas,2014; Pérez & Mota, 2010).

### **1.9.1 Bacterias gram positivas.**

#### **1.9.1.1 *Staphylococcus aureus.***

Esta bacteria anaerobia facultativa, es una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales en el ser humano (Hiramatsu *et al.*, 2001; Archer, 1998). La actividad biológica contra esta bacteria ha sido evaluada en diferentes basidiomicetos, se observa que la tendencia a la respuesta antimicrobiana es significativamente marcada teniendo en cuenta la resistencia que dicho microorganismo presenta a los antibióticos de uso común. En un estudio químico de actividad biológica del hongo *Ganoderma lucidum* se determinó que el extracto etanólico presenta una mejor actividad bactericida a una concentración de 150 mg/ML frente a la bacteria *S. aureus* (Segovia, 2017; Mora, 2010).

#### **1.9.1.2 *Enterococcus faecalis.***

En estudios realizados a hongos actinomicetos de origen marino se evaluó la actividad antibacteriana frente a *E. faecalis* y diferentes extractos, los resultados determinaron que los extractos obtenidos con éter de petróleo mantenían buen rendimiento contra *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *E. faecalis*, y *S. aureus*; en cambio los extractos de acetato de etilo mantenían mejor rendimiento frente a los hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, y *A. niger*. Basados en estos resultados se determinó que el sedimento marino es fuente promisorio de numerosas cepas de actinomicetos con gran capacidad de producir compuestos bioactivos capaces de inhibir patógenos tipificados como *E. faecalis* vancomicina-resistentes (León *et al.*, 2011).

#### **1.9.1.3 *Micrococcus luteus.***

Se caracterizan por producir pigmentos amarillos insolubles en agua y por soportar ambientes extremos. Se encuentran en ambientes diversos incluyendo agua y suelo, son catalasa positiva y la mayoría de las especies producen pigmentos carotenoides. A pesar de ser un organismo comensal o saprofítico particularmente se asocia a pacientes con inmunodeficiencia Adquirida (Deng *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2005).

## **1.9.2 Bacterias Gram Negativas.**

### **1.9.2.1 *Echerichia coli*.**

Es el microorganismo más frecuentemente implicado en bacteriemias nosocomiales y comunitarias, es un patógeno emergente asociado a Enfermedades Transmitidas por alimentos y agua contaminados, convirtiéndose en una de las bacterias más investigadas (Leotta *et al.*, 2005; García *et al.*, 2011).

Existe un sin número de especies de hongos con actividad frente a esta bacteria, los hongos *F. camptoceras* y *A. flocculosus* aislados de ambientes marinos presentan una actividad biológica marcada contra especies tanto Gram negativas como Gram positivas (Acosta, Guevara, & Crescente, 2011).

## **1.9.3 Levaduras.**

### **1.9.3.1 *Candida albicans*.**

Es un hongo dimórfico, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. Puede causar enfermedades fúngicas en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo pacientes con cáncer, pacientes trasplantados y aquellos con infecciones por virus como el VIH (Sanglard *et al.*, 2014; Olea Delfina, 2006; Calderone & Fonzi, 2001).

Existen un sin número de hongos con actividad frente a diferentes microorganismo, los hongos marinos son los más estudiados por su importancia a nivel farmacológico por lo cual estudios realizados en especies del género *Penicillium* han mostrado una gran actividad frente a cepas de *C. albicans*. Por otro lado los extractos de los hongos aislados de las raíces de mangle (*Rhizophora mangle* L.) inhibieron el crecimiento de la cepa levaduriformes *C. albicans* oportunista en humanos, mientras que los hongos fitopatogénicos, algunos pertenecientes al mismo género de los hongos marinos, no presentaron sensibilidad (Castillo-Machalskis, D'armas, Centeno, & Núñez, 2009).

## **1.10 Enzima $\alpha$ -Glucosidasa**

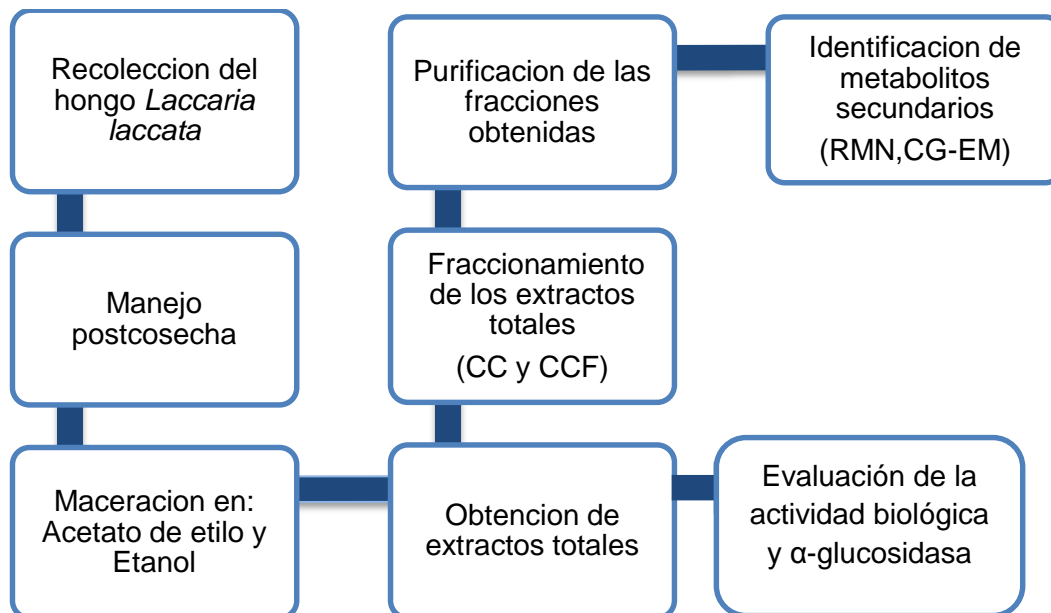
La alfa-glucosidasa actúa principalmente hidrolizando disacáridos a glucosa, su mecanismo principal consiste en interrumpir la absorción de glucosa en el tracto digestivo, prolongar el tiempo de digestión de los carbohidratos y disminuir la velocidad de absorción de glucosa. Los inhibidores de esta enzima se utilizan para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2,

los cuales reducen eficazmente la glucosa plasmática postprandial. Además, son de particular interés debido a su potencial como agentes antivirales y antimetastáticos (Naranjo, M *et al.*, 2016; Choi, Lee, & Kim, 2015).

**CAPÍTULO 2**  
**MATERIALES Y METODOS**

## 2.1 Metodología Empleada

Para el desarrollo de la presente investigación se realizó la siguiente metodología (Figura. 2).



**Figura 2.** Esquema metodológico de la investigación

**Fuente:** Autor, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

## 2.2 Recolección y selección de los basidiocarpos

El hongo *L. laccata*, se recolectó en el mes de mayo del 2015 en un bosque de pino en el sector de Zamora Huayco, cantón Loja, a una altitud de 2500 msnm, en las siguientes coordenadas geográficas: 4°0'17.1324"S., 79°11'3.39"W (Figura. 3). La muestra fue clasificada por el Ph.D. Darío Cruz en la sección de micología de la UTPL y una muestra se encuentra depositada con voucher de colecta JMA057.



**Figura 3.** *Laccaria laccata*

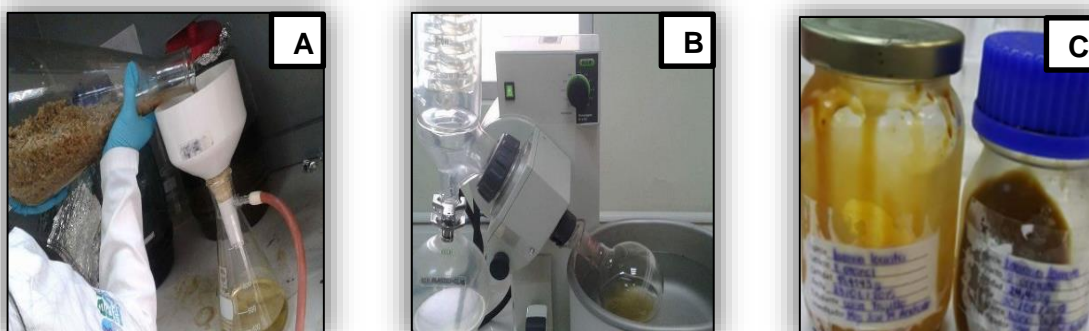
**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

El hongo recolectado se deshidrató en una cámara de secado a una temperatura de 34°C durante 2 semanas, luego se trituró para su posterior análisis.

### 2.3 Obtención de extractos totales.

A partir de 500 g del hongo deshidratado, este se sometió a maceración estática por 2 horas y maceración dinámica por 15 min con disolventes en polaridad creciente Acetato de etilo (AcOEt) y Etanol (EtOH), repitiendo el procedimiento tres veces con cada disolvente. El macerado se filtró al vacío y se concentró a presión reducida a una temperatura de 33°C hasta obtener los extractos totales secos (Figura. 4).



**Figura 4.** Obtención de los extractos totales: a) Maceración, b) Concentración, c) Extractos totales.

**Fuente:** Autora, 2017

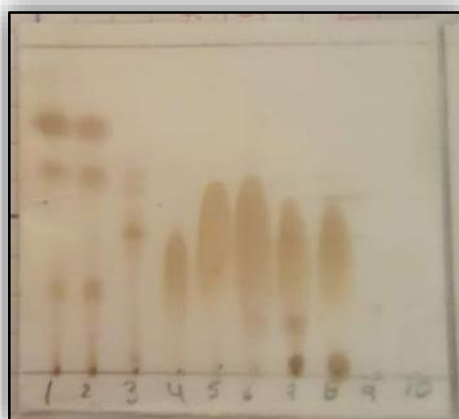
**Elaboración:** Autora, 2017

### 2.4 Cromatografía de capa fina (CCF)

Los extractos de Acetato de etilo y Etanol previo al fraccionamiento fueron analizados mediante CCF en distintas polaridades para así determinar la riqueza y separación de metabolitos secundarios presentes en cada extracto, para lo cual se emplearon placas de fase directa de silica gel on TLC Al Foils (F254 nm) (Sigma-Aldrich), y en fase inversa silica gel 60 RP-18 (F<sub>254</sub>S) (MERCK). Las placas fueron reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina, finalmente se visualizaron en luz UV a 254 y 365 nm.

### 2.5 Fraccionamiento del extracto Acetato de Etilo

Se utilizó 2g de extracto en una relación 1:100 (muestra: silica), se eluyó con solventes en polaridad creciente iniciando con Hex/AcOEt 90:10 hasta finalizar con 50:50. Se obtuvieron un total de 180 fracciones a las cuales se realizó CCF, utilizando placas de silica gel 60 F254 (fase directa), se unieron las fracciones de acuerdo a su RF y color de las manchas teniendo un total de 10 Fracciones (LLaC1-LLaC10) (Figura. 5).



**Figura 5.** CCF de las fracciones (1-10) eluidas en Hex/AcOEt (9:1).  
**Fuente:** Autora, 2017  
**Elaboración:** Autora, 2017

En la tabla 2 se observan las 10 fracciones unidas (LLaC1-LLaC10).

**Tabla 2.** Fracciones obtenidas del extracto de Acetato de Etilo y sus pesos respectivos.

CÓDIGO	FRACCIONES	Peso (mg)
LLaC1	34-36	32,6
LLaC2	37-50	7
LLaC3	51-53	14,2
LLaC4	54-56	193,7
LLaC5	57-70	490,1
LLaC6	71-79	752,3
LLaC7	80-112	344,4
LLaC8	113-127	27
LLaC9	128-160	15
LLaC10	161-180	32,6

**Fuente:** Autora, 2017  
**Elaboración:** Autora, 2017

## 2.6 Purificación de los compuestos

### 2.6.1 Fracción LLaC1.

La fracción LLaC1 34-36, se purificó mediante cromatografía en columna (CC), para lo cual se pesó 10g de Silica Gel fase directa en 32,6 mg de la fracción obtenida, utilizando como eluyente Hex/AcOEt en polaridad creciente iniciando con 95:5 y terminando con 8:2. Se



obtuvieron 12 fracciones (HLLaC1-HLLaC12). La fracción HLLaC3 de acuerdo a la cromatografía en capa fina presentó características de compuesto puro, indicando una sola mancha al ser revelada (Figura. 6) obteniendo el compuesto 1.



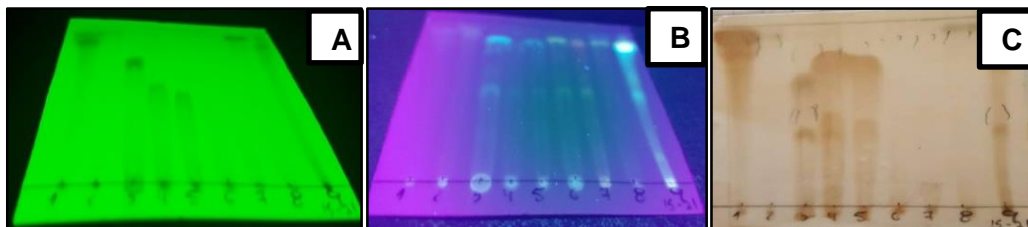
**Figura 6.** CCF de la fracción HLLaC3 eluída en Hex/AcOEt (9:1).

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

## 2.7 Fraccionamiento del extracto de Etanol.

Se utilizó 2g de extracto en una relación 1:100 (muestra: silica) fase directa, se eluyó con solventes en polaridad creciente iniciando con Hex/AcOEt 9:1 y finalizando con AcOEt/MeOH 9:1. Se obtuvieron un total de 125 fracciones que fueron analizadas por CCF, utilizando placas de silica gel 60 F254 (fase directa) y se unieron las fracciones de acuerdo a su RF y color de las manchas obteniendo 8 Fracciones (Fle1-Fle8) (Figura. 7).



**Figura 7.** CCF de las fracciones obtenidas eluidas en Hex/AcOEt (3:2): a) Luz UV 254nm, b) Luz UV 365nm, c) Placa revelada.

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

En la tabla 3 se indican las 8 fracciones obtenidas (Fle 1 - Fle 8), con sus respectivos pesos.

**Tabla 3.** Fracciones del extracto de Etanol.

<b>CÓDIGO</b>	<b>FRACCION</b>	<b>PESO (mg)</b>
Fle 1	2-5	58,9
Fle 2-4	9-12	4,4
Fle 5	15-21	8,5
<b>Fle 6-8</b>	<b>22-24</b>	<b>16,4</b>
Fle 9-10	31-41	146,6
Fle 11-12	54-66	32,1
Fle 13-17	81-90	33,6
Fle 18	120-125	7

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

### **2.7.1 Fracción Fle 6-8.**

La fracción Fle (6-8), se purificó mediante cromatografía en columna (CC) con una relación 1:100 (muestra: silica), para lo cual se pesó 5g de silica gel fase directa en 16,4 mg de la muestra obtenida utilizando como eluyente una polaridad isocrática Hex/AcOEt (3:2). Se obtuvieron 11 fracciones (FleM1-FleM11) que fueron analizadas mediante CCF, mostrando las fracciones (FleM 5-6 y FleM 9-10) una sola mancha, dando lugar al compuesto 2 y compuesto 3 respectivamente (Figura. 8) y (Figura. 9).



**Figura 8.** CCF de la fracción (5-6), eluída en Hex/AcOEt (3:2).

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017



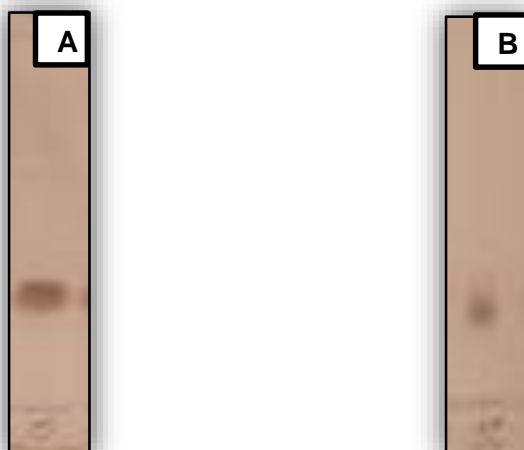
**Figura 9.** CCF de la fracción (9-10), eluída en Hex/AcOEt (3:2).

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

## 2.8 Fraccionamiento del extracto de Etanol

Se utilizó 1g de extracto en una relación 1:100 (muestra: sílica) fase inversa, se eluyó con solventes en polaridad creciente iniciando con MeOH/H<sub>2</sub>O 95:05 y finalizando con MeOH /acetonitrilo 9:1, obteniéndose 168 fracciones que fueron analizadas por CCF, utilizando placas de Silica Gel Rp18 (fase inversa), la fracción 22 y 55 presentan características de compuestos puros, dando como resultado el compuesto 4 y 5 respectivamente (Figura. 10).



**Figura 10.** CCF de las fracciones 22 y 55, eluidas en (MeOH/H<sub>2</sub>O 95:05).

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

## 2.9 Caracterización de compuestos purificados

### 2.9.1 Resonancia Magnética Nuclear.

Los compuestos aislados se identificaron a través de análisis de espectros de Resonancia Magnética Nuclear, en un equipo Varian N° de serie 21953, <sup>1</sup>H en 400 MHz y <sup>13</sup>C en 100 MHz, empleando como disolvente CDCl<sub>3</sub>, donde los desplazamientos químicos se indican en unidades delta (ppm) relativos a la señal de TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

### 2.9.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

Los compuestos fueron analizados mediante un cromatógrafo de gases serie 6890N acoplado a espectrometría de masas Agilent serie 5973 inert, que cuenta con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, en el cual se realizaron inyecciones de los compuestos a analizar. Las características de la columna capilar se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Características de la Columna Capilar

<b>Características de la Columna Capilar</b>					
<b>Columna</b>	<b>Modelo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Diámetro Interno</b>	<b>Longitud</b>	<b>Película</b>
<b>DB.5MS</b>	Agilent 122-5532	350°C	0.25 mm	30 m	0.25 µm

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

Para este procedimiento se tomó en cuenta ciertos parámetros operacionales los que se detallan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Parámetros operacionales del CG-EM de la columna DB-5MS.

<b>COLUMNA</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Columna capilar DB-5MS</li><li>✓ Modelo Agilent 122-5532</li><li>✓ 0.25mm 30m 0.25um</li><li>✓ Temperatura máxima 350°C</li><li>✓ Flujo constante</li><li>✓ Flujo inicial: 1ml/min</li><li>✓ Presión nominal: 52.6 kpa</li><li>✓ Velocidad promedio: 36 cm/seg.</li><li>✓ Presión salida: vacío.</li></ul>
<b>DETECTOR</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Espectrómetro de masas.</li><li>✓ Temperatura de cuádruplo 200°C.</li><li>✓ Temperatura de la fuente 280°C.</li><li>✓ Modo Scan</li></ul>
<b>HORNO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Temperatura inicial 50°C</li><li>✓ Tiempo inicial 3min.</li><li>✓ Rampa de Temperatura 10°C/min</li><li>✓ Temperatura final 270°C</li></ul>
<b>INYECTOR</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Modo Split.</li><li>✓ Radio de partición 1:1</li><li>✓ Temperatura inicial 250°C</li><li>✓ Gas Helio</li></ul>

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

## 2.10 Actividad biológica de los extractos

### 2.10.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C, el mismo que da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. La determinación de la CMI se evaluó mediante la técnica de Microdilución en caldo, utilizando placas de 96 pocillos.

### 2.10.2 Microorganismos de prueba.

Para la determinación de la actividad biológica se utilizaron 4 cepas bacterianas y 1 fúngica:

- ✓ **Cepas bacterianas Gram Positivas:** *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433) y *Micrococcus luteus* (ATCC® 10240).
- ✓ **Cepa bacteriana Gram Negativa:** *Escherichia coli* (ATCC® 43888).
- ✓ **Cepa fúngica:** *Candida albicans* (ATCC® 10231).

### 2.10.3 Preparación de la muestra.

La muestra fue preparada utilizando 100mg de los extractos de Acetato de etilo y Metanol, los mismos que fueron diluidos en 1000µl de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se utilizó para la determinación de la CMI tanto para bacterias como para hongos.

### 2.10.4 Preparación del cultivo overnight.

Los microorganismos utilizados se encuentran en reserva criogénica a -80°C. Los medios de cultivo y condiciones de incubación se detallan en la tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de incubación y medios de cultivo.

<b>BACTERIAS</b>	<b>MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>TEMPERATURA DE INCUBACIÓN</b>	<b>TIEMPO DE INCUBACIÓN</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™)	Caldo Soya Trypticasa	37°C	14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC® 19433™)	Infusión cerebro corazón	37°C	14-16 horas
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 43888™)	Caldo Soya Trypticasa	37°C	14-16 horas
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC® 10240™)	Caldo nutritivo	35°C	14-16 horas
<b>LEVADURA</b>			
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™)	Caldo Sabouraud	35°C	14-16 horas

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

## **2.10.5 Preparación de la suspensión del inóculo para microorganismos.**

### **2.10.5.1 Inóculo para bacterias.**

A partir de 10 µL del cultivo overnight con la bacteria a utilizar se colocó 10mL del caldo Muller Hinton, de esta dilución se tomaron 100µl para completar el volumen final 200µl de la placa de cultivo.

### **2.10.5.2 Inóculo para levaduras.**

A partir 10 µL del cultivo overnight con la bacteria a utilizar se colocó 10mL del caldo Sabouraud, de esta dilución se tomaron 100µl para completar el volumen final 200 µL de la placa de cultivo.

## **2.11 Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

### **2.11.1 Concentración Mínima Inhibitoria Antimicrobiana.**

La CMI se realizó en placas estériles de 96 pocillos, para lo cual primero se colocó 180µl de caldo Muller Hinton (o Sabouraud) en la primera fila y 100µl en los pocillos restantes. A continuación, en los pocillos de la fila A se adicionaron 20µl del extracto diluido. Realizamos el procedimiento de dilución doble seriada, tomando 100µl de los pocillos de la fila A y

diluimos en los pocillos de la fila B, continuamos con esta dilución hasta llegar a los pocillos de la fila H y desechamos los 100  $\mu\text{L}$  sobrante, con lo que aseguramos diluciones desde 5000 hasta 39,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para el control de esterilidad se utilizó la columna A10 – H10, colocando 200 $\mu\text{l}$  del caldo Muller Hinton (o Sabouraud). Para el control negativo en la columna A11 se coloca 180 $\mu\text{l}$  de caldo + 20 $\mu\text{l}$  de DMSO y para el control positivo en la columna A12 se coloca: 180 $\mu\text{l}$  de caldo + 20 $\mu\text{l}$  de una solución de gentamicina de 1mg/mL. Para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*, tetraciclina de 5mg/mL. Para *Enterococcus faecalis* e Itraconazol de 1mg/mL para *Candida albicans*.

Una vez preparadas las placas se inocularon con 100 $\mu\text{l}$  de la suspensión del inóculo completando el volumen final, ajustando la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL para bacterias y  $5 \times 10^4$  UFC/mL para levaduras. Finalmente se sellan las placas, incubándose a 35°C durante 24 horas.

## 2.12 Actividad enzimática

### 2.12.1 Ensayo de $\alpha$ -glucosidasa.

La actividad inhibidora de la enzima  $\alpha$  glucosidasa se realizó utilizando una placa de microtitulación con *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNPG, SIGMA N1377) como sustrato, basados en el método descrito por (Tao, Zhang, Cheng, & Wang, 2013), con ligeras modificaciones, usando acarbosa como control positivo. Las soluciones de muestra se prepararon usando 10mg de extracto en 210  $\mu\text{L}$  de MeOH de manera que obtengamos como concentración final 2mg/mL. En el ensayo, en caso de conseguir la inhibición completa de la enzima se prepararon varias diluciones en PBS.

En primer lugar se tomó 75  $\mu\text{L}$  de PBS (SIGMA-P4417), se mezcló con 5 $\mu\text{l}$  de la muestra y 20 $\mu\text{l}$  de la solución de enzima (SIGMA G5003, 0,15UI/mL en PBS pH 7.4), y se preincubó a 37°C durante 5 min antes de la iniciación de la reacción por la adición del sustrato.

Posteriormente se añadió 20 $\mu\text{l}$  de una solución de PNPG (tampón fosfato 5mM, pH 7.4) a cada pocillo y se incubó durante 60 min a 37°C. La cantidad de para-nitrofenol (*p*-NP) liberado, se midió en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK®) a 405nm, registrando la absorbancia cada 5 minutos.

La actividad inhibidora (%) se calculó de acuerdo a la fórmula descrita por (Choi, Lee, & Kim, 2015).



$$\text{Inhibición (\%)} = [(A_o - A_s) / A_o] \times 100$$

Donde cada una de las variables representan lo siguiente:

**A<sub>o</sub>**: Absorbancia registrado para la actividad enzimática sin inhibidor (control).

**A<sub>s</sub>**: Absorbancia registrada para la actividad enzimática en presencia del inhibidor (muestra).

**CAPITULO 3**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 Extractos obtenidos de *Laccaria laccata*

A continuación se muestran en la tabla 7 el rendimiento de los extractos obtenidos de Acetato de etilo y Etanol a partir de 500g de muestra seca.

**Tabla 7.** Peso y rendimiento del extracto de AcOEt y EtOH.

Extracto	Peso inicial de la muestra seca (g)	Peso final (g)	Rendimiento%
Acetato de etilo	500g	24.45	4.8
Etanol		15.41	3.1

Fuente: Autora, 2017  
Elaboración: Autora, 2017

### 3.2 Compuestos aislados de *Laccaria laccata*

De los extractos de Acetato de etilo y Etanol se aislaron e identificaron los siguientes compuestos:

**Tabla 8.** Compuestos aislados de *L. laccata*.

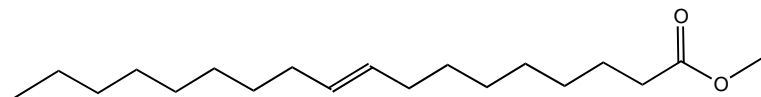
Extractos	Código	Nombre del compuesto	Polaridad	Peso
AcOet	Compuesto 1	Ácido oleico metil éster	9:1 MeOH/H <sub>2</sub> O	13,2mg
	Compuesto 2	Ergosterol	3:2 Hex/AcOEt	5mg
EtOH	Compuesto 3	Peróxido de Ergosterol	3:2 Hex/AcOEt	4mg
	Compuesto 4	Ácido linoleico etil éster	95:5 MeOH/H <sub>2</sub> O	3,8mg
	Compuesto 5	Ácido oleico	95:5 MeOH/H <sub>2</sub> O	2,6mg

Fuente: Autora, 2017  
Elaboración: Autora, 2017

### 3.3 Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo

#### 3.3.1 Compuesto 1.

Se obtuvo un aceite de color amarillo con peso molecular de 296 g/mol, correspondiente a la fórmula química  $C_{19}H_{36}O_2$ , mediante análisis de  $^1H$ NMR y comparado con literatura se identificó como Ácido oleico metil éster (Won *et al.*, 2007) (Figura. 11).



**Figura 11.** Estructura química del Ácido oleico metil éster

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

En la tabla 9 se indican los desplazamientos químicos de la molécula identificada y corroborada con literatura.

**Tabla 9.** Comparación de  $^1H$  NMR del Ácido oleico metil éster.

Datos Experimentales $^1H$ NMR (400 MHz) ( $\delta$ )	$^1H$ NMR (400 MHz) ( $\delta$ ) (Won <i>et al.</i> , 2007)
5.34 (m, =CH)	5.33 (m, =CH)
3.67(s, OCH <sub>3</sub> )	
2.30 (t, J=7.2 Hz, $\alpha$ -CH <sub>2</sub> )	2.33 (t, J=7.5 Hz, $\alpha$ -CH <sub>2</sub> )
2.00-2.03 (m, allylic CH <sub>2</sub> )	1.97-2.01 (m, allylic CH <sub>2</sub> )
1.61 (m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> )	1.60 (m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> )
1.27 (CH <sub>2</sub> )	1.24-1.32 (CH <sub>2</sub> )
0.88 (t, J=7.2 Hz, CH <sub>3</sub> )	0.86 (t, J=7.0 Hz)

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

El  $^1H$ -NMR muestra una señal olefínica en la posición  $\delta$  5.34, un singulete en la posición  $\delta$  3.67 que corresponde al grupo metoxilo, un triplete a  $\delta$  2.30 que corresponde al metileno en posición alpha unido al grupo carboxílico, los protones alílicos se encuentran entre  $\delta$  2.00-2.03, además un multiplete que corresponde al metileno en posición beta del grupo carboxílico en 1.61 y un triplete a  $\delta$  0.88 correspondiente al protón metilo terminal (Anexo 1).

Los ácidos grasos insaturados pueden controlar eficazmente los factores que causan la caries dental, además, el ácido oleico está muy extendido en la naturaleza y

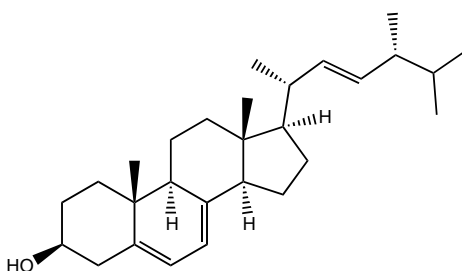
abundantemente disponible en un estado altamente puro. Por estas razones, el ácido oleico es un agente prometedor para prevenir la caries dental eficazmente (Won *et al.*, 52007).

En un estudio que se realizó para evaluar la Glucosiltransferasa (GTase) la cual es producida por *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, que son los principales agentes causantes de la caries dental se evaluó la actividad tanto del ácido oleico como del ácido oleico metil éster para lo cual se determinó que, la actividad inhibidora de la GTasa del ácido oleico fue significativamente mayor que la del ácido oleico metil éster. Estos datos muestran claramente que la presencia del grupo carboxilo del ácido graso no solo es crucial para su actividad inhibidora de GTasa. Se puede concluir entonces que los ácidos grasos saturados e insaturados expresan la actividad inhibidora de la GTasa de manera diferente, debido a que los ácidos grasos insaturados con uno o dos dobles enlaces es mucho más eficaz que un ácido graso saturado (Won *et al.*, 2007).

### 3.4 Fraccionamiento del extracto de Etanol

#### 3.4.1 Compuesto 2.

Se presentó en forma de cristales blancos con peso molecular de 396 g/mol, correspondiente a la fórmula química  $C_{28}H_{44}O$ , mediante análisis de  $^1H$ NMR comparado con literatura se identificó como Ergosterol (Márquez-Fernández, Juárez Pacheco, & Trigos, 2014; Juárez L., 2013 ) (Figura. 12).



**Figura 12.** Estructura química del Ergosterol

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

En la tabla 10 se indican los desplazamientos químicos de la molécula identificada y corroborada con literatura.

**Tabla 10.** Comparación de <sup>1</sup>H NMR del Ergosterol.

Datos Experimentales <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) (δ)	<sup>1</sup> H NMR (Juárez L., 2013).
5.57 (1H, dd H-6)	5.58 (1H, dd, J = 5.6, 2.3 Hz H-6)
5.38 (1H, dd, H-7)	5.38 (1H, dd, J = 5.3, 2.2 Hz, H-7)
5.20 (2H, m, H-22 y H-23)	5.20 (2H, m, H-22 y H-23)
3.63 (1H, m, H-3)	3.64 (1H, m, H-3)
0.63 (3H, s, Me-18)	0.65 (3H, s, Me-18)
0.95 (3H, s, Me-19)	0.95 (3H, s, Me-19)
0.81 (3H, d, J= 7.2 Hz, Me-26)	0.84 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me-26)
0.85 (3H, d, J= 6.4 Hz, Me-27)	0.82 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me-27)
0.92 (3H, d, J= 7.2 Hz, Me-28)	0.92 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me-28)
1.03 (3H, d, J= 6.4 Hz, Me-21)	1.04 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me-21)

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

El <sup>1</sup>H-NMR muestra una señal a campo bajo a δ 5.57 ppm y a δ 5.38, dos señales complejas que corresponden a los protones vinílicos H-6 y H-7 respectivamente y otra en 5.20 ppm que corresponde a los protones vinílicos H-22 y H-23. Mientras que a 3.62 ppm se observa una señal múltiple originada por el protón H-3, ambos protones son germinales a un grupo hidroxilo. A campo alto, se aprecian las siguientes señales correspondientes a los seis metilos que se encuentran a δ 0.63, 0.95, 0.82, 1.03, 0.92, 0.85 ppm respectivamente (Anexo 2).

El Ergosterol, es un lípido que se encuentra presente en los hongos como constituyente de sus membranas, pertenece a la familia de los esteroides que son los más abundantes en el reino fungi, y se caracteriza principalmente por poseer un grupo hidroxilo en posición β (Chiocchio & Matković, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

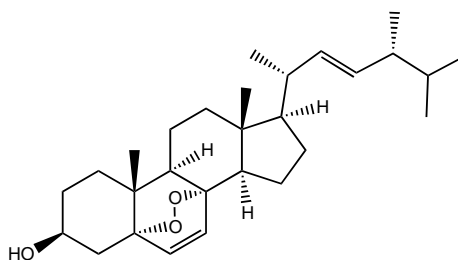
Es un triterpeno utilizado en la producción de cortisona y la hormona progesterona y es uno de los principales precursores sintéticos de la vitamina D<sub>2</sub> (Otálvaro S., Mariscal J., Hernández, N., 2011), la cual funciona como una hormona esteroide que induce respuestas fisiológicas actuando sobre el sistema cardiovascular, desarrollo neurológico y regulación del crecimiento celular (Enith, Blanco, & Maya, 2011).

Presenta importantes actividades biológicas como anticancerígeno, anticoagulante y antitumoral con perspectivas prometedoras tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, además se ha reportado como un compuesto con actividad inhibitoria en el crecimiento de cáncer en ratas por lo cual actualmente es considerado como un potente fármaco capaz de inducir la

muerte de células cancerosas (Martinez, Alvarez, Campi, Bravo, & Vila, 2015; Zhang *et al.*, 2016)

### 3.4.2 Compuesto 3.

Se presentó en forma de cristales blancos con peso molecular de 428 g/mol, correspondiente a la fórmula química  $C_{28}H_{44}O_3$ , mediante análisis de  $^1H$ NMR y comparado con literatura se identificó como Peróxido de Ergosterol (Nam, Jo, Kim, Hyun, & Kim, 2001; Kim *et al.*, 2005) (Figura. 13).



**Figura 13.** Estructura química del Peróxido de Ergosterol

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

En la tabla 11 se indican los desplazamientos químicos de la molécula identificada y corroborada con literatura.

**Tabla 11.** Comparación de  $^1H$  NMR del Peróxido de Ergosterol.

Datos Experimentales $^1H$ NMR (400 MHz) ( $\delta$ )	$^1H$ NMR (400 MHz) ( $\delta$ ) (Kim et al., 2005)
6.24 (1H, d, J=8.4 H-6)	6.22 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6)
6.50 (1H, d, J=8.8 H-7)	6.48 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-7)
5.18 (2H, m, H-22 y H-23)	5.14 (2H, m, H-22 y H-23)
3.97 (1H, m, H-3)	3.92 (1H, m, H-3)
0.81 (3H, s, Me-18)	0.77 (3H, s, Me-18)
0.88 (3H, s, Me-19)	0.84 (3H, s, Me-19)
0.82 (3H, d, J= 7.2 Hz, Me-26)	0.79 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me-26)
0.84 (3H, d, J= 6.4 Hz, Me-27)	0.77 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me-27)
0.91 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-28)	0.86 (3H, d, J= 7.2 Hz, Me-28)
1.00 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-21)	0.95 (3H, d, J= 6.4 Hz, Me-21)

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

El  $^1H$ -NMR muestra una señal a campo bajo a  $\delta$  6.24 ppm y  $\delta$  6.50, que corresponde al grupo peróxido y otra en 5.18 ppm que corresponde a los protones vinílicos H-22 y H-23. Mientras que a 3.97 ppm se observa una señal múltiple originada por el protón H-3, ambos

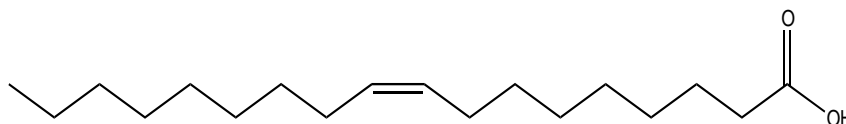
protones son germinales a un grupo hidroxilo. A campo alto, se aprecian las siguientes señales correspondientes a los seis metilos que se encuentran a  $\delta$  0.81, 0.88, 1.00, 0.82, 0.84, 0.91 ppm respectivamente (Anexo 3).

El peróxido de ergosterol es un esteroide natural que se ha encontrado en una variedad de hongos, líquenes y esponjas, producido por hongos comestibles o medicinales. En los hongos es sintetizado por la conversión del ergosterol en su epóxido, puede desempeñar un papel en la reacción de desintoxicación de especies reactivas de oxígeno y, en células neoplásicas, ha mostrado propiedades tumorcidas (Kim *et al.*, 1997).

Es conocido por ser un importante esteroide antitumoral con una fuerte actividad anticomplementaria, en los hongos, el peróxido de ergosterol, sintetizado por la conversión del ergosterol en su epóxido, puede desempeñar un papel en la reacción de desintoxicación de especies reactivas de oxígeno y, en células neoplásicas, ha mostrado propiedades tumorcidas (Yusso, Yutaka, & Minoru, 2001). Basándose en los resultados descritos anteriormente se podría concluir que este compuesto presenta una fuerte actividad citotóxica y anticomplementaria, por otro lado estudios previos han demostrado que el peróxido de ergosterol presenta una actividad antitumoral contra el carcinosarcoma de Walker y las líneas celulares de adenocarcinoma mamario humano (Da Graça Sgarbi *et al.*, 2005).

### 3.4.3 Compuesto 4.

Se presentó un aceite de color amarillo con peso molecular de 282 g/mol, correspondiente a la fórmula química  $C_{18}H_{34}O_2$ , mediante análisis de  $^1H$ NMR y CG-EM y comparado con literatura se identificó como Ácido oleico ( Ragasa, Ng, Agoo, & Shen, 2015) (Figura. 14).



**Figura 14.** Estructura química del Ácido oleico  
**Fuente:** Autora, 2017  
**Elaboración:** Autora, 2017

En la tabla 12 se indican los desplazamientos químicos de la molécula identificada y corroborada con literatura.



**Tabla 12.** Comparación de <sup>1</sup>H NMR del Ácido oleico.

Datos Experimentales <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) (δ)	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz) (δ) (Ragasa, Ng, Agoo, & Shen, 2015)
5.35 (m, =CH )	5.33 (m, =CH)
2.27 (t, J= 7.6 Hz, α- CH <sub>2</sub> )	2.33 (t, J = 7.5 Hz, α-CH <sub>2</sub> )
2.03-2.06 (m, allylic CH <sub>2</sub> )	1.97-2.01 (m, allylic CH <sub>2</sub> )
1.59 (m, β-CH <sub>2</sub> )	1.60 (m, β-CH <sub>2</sub> )
1.33 (CH <sub>2</sub> )	1.24-1.32 (CH <sub>2</sub> )
0.88 (t, J = 6.8 Hz)	0.86 (t, J = 7.0 Hz)

**Fuente:** Autora, 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

La señal de <sup>1</sup>H-NMR indica la presencia de protones olefínicos en la posición δ 5.33 observamos un multiplete amplio, indicando los protones vinílicos de los dobles enlaces en las cadenas del ácido graso insaturado. En la señal δ 2.27 observamos los protones alílicos en posición alpha del grupo carboxílico y fragmentos de ácidos grasos, entre δ 2.03-2.06 un multiplete que indica la presencia de protones metílenos que están unidos al doble enlace. La señal δ 1.59 indica un multiplete perteneciente al protón metileno en posición beta del ácido graso, finalmente un protón metilo terminal a δ 0.88 (Anexo 4).

El ácido oleico es un ácido graso libre *cis*-monoinsaturado que se encuentra abundantemente en la naturaleza, incluso en la piel humana, representa aproximadamente el 30 al 40% de los ácidos grasos presentes en mezclas de triglicéridos y es el componente principal del aceite de maíz. El ácido oleico está formado por 18 átomos de carbono, un doble enlace en el carbono 9 y un grupo carboxílico (el-Sharkawy, Yang, & Dostal, 2001; Zamora A., 2017). Su principal mecanismo de acción es la capacidad de mejorar la permeabilidad cutánea desorganizando las estructuras lipídicas intercelulares sin ningún daño tóxico (Moreira, de Sousa, & Pierre, 2010).

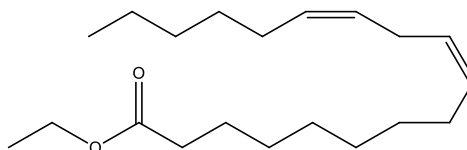
Un estudio reciente informó que el ácido oleico no solo inhibe el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas sino también promueve la muerte celular apoptótica de las células de cáncer de mama (Ragasa *et al*, 2015).

El ácido oleico es un potenciador de uso común, cuyo mecanismo de acción, ha sido ampliamente estudiado *in vitro*. Estudios previos han demostrado que inhibe la actividad de las células endoteliales NOS, esto debido a que los ácidos grasos, incluyendo el ácido oleico, pueden modular varios procesos de transporte de cationes de membrana, incluyendo Ca<sup>2+</sup>. Dado que el NOS de tipo III en las células endoteliales es una enzima dependiente de

calcio, estas investigaciones plantearon la posibilidad de que el ácido oleico inhiba la NOS reduciendo la concentración o el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Davda, R *et al.*, 2000).

### 3.4.4 Compuesto 5.

Se presentó un aceite de color amarillo con peso molecular de 308.50g/mol, correspondiente a la fórmula química  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$ , mediante análisis de  $^1\text{H-NMR}$  y CG-EM y comparado con literatura se identificó como Ácido linoleico etil éster (Choppa, Selvaraj, & Zachariah, 2015; Won *et al.*, 2007) (Figura. 15).



**Figura 15.** Estructura química del Ácido linoleico etil éster  
**Fuente:** Autora, 2017  
**Elaboración:** Autora, 2017

En la tabla 13 se indican los desplazamientos químicos de la molécula identificada y corroborada con literatura.

**Tabla 13.** Comparación de  $^1\text{H NMR}$  del Ácido linoleico etil éster.

Datos Experimentales $^1\text{H NMR}$ (400 MHz) ( $\delta$ )	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz) ( $\delta$ ) ( Ragasa <i>et al</i> , 2015)
5.35 (m, =CH )	5.37 (m, =CH)
4.07 (dd, J=7.2 Hz, CH2)	
2.83 (m, CH2)	2.78 (m,CH2)
2.27 (t, J=7.6 Hz, $\alpha$ -CH2)	2.33 (t, J=7.5 Hz, $\alpha$ -CH2)
2.05 (m, allylic CH2)	1.97-2.01 (m, allylic CH2)
1.58 (m, $\beta$ -CH2)	1.60 (m, $\beta$ -CH2)
1.30 (CH2)	1.24-1.32 (CH2)
1.20 (t, J=7.2 Hz, CH3)	
0.88 (t, J=6.8 Hz, CH3)	0.86 (t, J=7.0 Hz)

**Fuente:** Autora, 2017  
**Elaboración:** Autora, 2017

El  $^1\text{H-NMR}$  muestra una señal olefínica en la posición  $\delta$  5.35, un doble de dobles en la posición  $\delta$  4.07 perteneciente a los protones metilenos, un multiplete en la posición  $\delta$  2.83, un triplete a  $\delta$  2.27 que corresponde al metileno en posición alpha unido al grupo carboxílico, los protones alílicos se encuentran  $\delta$  2.05, además un multiplete que corresponde al

metileno en posición beta del grupo carboxílico en  $\delta$  1.58 y un triplete a  $\delta$  0.88 y  $\delta$  1.20 correspondiente a los protones metilos terminal (Anexo 5).

El ácido linoleico es el ácido graso poliinsaturado más prominente en la dieta occidental, pertenece a los ácidos grasos omega-6 y está formado por 18 átomos de carbono con dos enlaces dobles en el carbono 9 y 12 que lo distingue del ácido oleico (Ragasa *et al*, 2015; Zamora A., 2017). Se encuentra prácticamente en todos los alimentos que consumimos, productos lácteos, verduras, aceites vegetales, cereales, frutas, nueces, legumbres, semillas y panes (Whelan, 2008).

Estudios previos han reportado el ácido linoleico como un fuerte anticancerígeno, Así mismo se ha comprobado que reduce el riesgo de cáncer de colon y enfermedades cardiovasculares (Ragasa *et al*, 2015). De forma similar, existen datos epidemiológicos que sugieren que el ácido linoleico puede desempeñar un papel protector en la enfermedad vascular, lo cual es apoyado por estudios in vitro. Además el ácido gamma-linolénico en forma de aceite de onagra se ha utilizado para tratar la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y el síndrome premenstrual (Chan, Thomas, & Tomlinson, 2002; Kennedy, Reader, & Davies, 1993).

### 3.5 Determinación de la actividad biológica de los extractos

#### 3.5.1 Actividad antimicrobiana.

Los extractos obtenidos (Acetato de etilo, etanol) de *Laccaria laccata*, no presentaron actividad antimicrobiana para ninguna de las cepas evaluadas en el ensayo como se muestra en la tabla 14.

**Tabla 14.** CMI antibacteriana de los extractos totales obtenidos de *L. laccata*

Microorganismos	AcOEt ( $\mu\text{g/mL}$ )	EtOH ( $\mu\text{g/mL}$ )	ATB ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA	0,39
<i>Enterococcus Faecalis</i>	NA	NA	1,9
<i>Micrococcus luteus</i>	NA	NA	< 0,39
<i>Echerichia coli</i>	NA	NA	1,56
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	25

Referencia: NA (No Activo)

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

### 3.5.2 Actividad enzimática de los extractos totales.

La actividad inhibitoria en  $\alpha$ -glucosidasa in vitro de los extractos totales obtenidos (AcOEt y EtOH) de *L. laccata*, se presentan en la tabla 15.

**Tabla 15.** Efecto inhibitor de  $\alpha$ -glucosidasa en extractos totales de *L. laccata*.

Extractos Totales	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
AcOEt	24,17

**Fuente:** Autora 2017

**Elaboración:** Autora, 2017

En el ensayo realizado de  $\alpha$ -glucosidasa, el extracto de etanol no mostro actividad inhibitora sobre la enzima, mientras que el extracto de Acetato de etilo exhibió una fuerte actividad con un valor IC<sub>50</sub> de 24,17  $\mu$ g/ mL, en otras investigaciones en las que se evaluó la actividad inhibitora de  $\alpha$ -glucosidasa de hongos basidiomicetos, se observó un % de inhibición de 28.93 para el extracto de acetato de etilo (Espinoza *et al.*, 2013), podemos decir que al evaluar la actividad enzimática de nuestro extracto y comparando con otros extractos fúngicos el extracto de acetato de etilo es un fuerte inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. El dato obtenido e importante ya que se ha comprobado que los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa que actúan hacia las enzimas en el intestino retrasan efectivamente el nivel de glucosa en sangre, disminuyendo la absorción de glucosa (Naranjo *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 50  $\mu$ M tienen una fuerte actividad inhibitora contra  $\alpha$ -glucosidasa (Wang *et al.*, 2015).

Este es el primer estudio de la actividad hipoglucemiante reportado en especies de la familia Hydnangiaceae.

## **CAPITULO 4.**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

Se identificaron un total de 5 compuestos mediante técnicas espectroscópicas como NMR y CG-EM. Del extracto total de acetato de etilo se identificó el Ácido oleico metil éster y del extracto de Etanol se identificaron el ergosterol, peróxido de ergosterol, ácido oleico y ácido linoleico etil éster.

La actividad antimicrobiana evaluada mediante el método de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de Acetato de etilo y etanol del Hongo *Laccaria laccata*, no presentaron actividad para ninguna de las cepas empleadas en el ensayo.

En el ensayo realizado de  $\alpha$ -glucosidasa, el extracto de etanol no mostro actividad inhibidora sobre la enzima, mientras que el extracto de Acetato de etilo exhibió una fuerte actividad con un valor  $IC_{50}$  de 24,17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , demostrando ser un fuerte inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

## RECOMENDACIONES

Continuar con el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Laccaria laccata* en diferentes disolventes ya que no se cuenta con datos relevantes acerca de su composición química, la cual sería importante en la búsqueda de nuevos compuestos químicos con posible actividad farmacológica.

Realizar más pruebas de actividad biológica como antioxidantes, anticancerígenos de los extractos y moléculas identificadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M., Guevara, M., & Crescente, Ó. (2011). Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *Fusarium camptoceras* wollenw y Reinking y *Aspergillus flocculosus* Frisvard y Samson, aislados de ambientes marinos.
- Aguirre-acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., & Cifuentes, J. (2014). Biodiversidad de hongos en México Biodiversity of fungi in Mexico, 76–81.
- Alejandro-Espinosa, M., Jaramillo-Fierro, X., Ojeda-Riascos, S., Malagón-Aviles, O., & Ramírez-Robles, J. (2013). Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12(1).
- Alexandre, T. R., Lima, M. L., Galuppo, M. K., Mesquita, J. T., do Nascimento, M. A., dos Santos, A. L., ... Tempone, A. G. (2017). Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 23(1), 30.
- Andrade, J. M., Malagón, O., Piepenbring, M., & Armijos, C. (2012). Etnomicología y valor nutricional de macrohongos silvestres de la comunidad indígena Saraguro en el sur del Ecuador. Dpto. de Química, Sección de Procesos, Universidad Técnica Particular de Loja, (January), 193–202.
- Archer, G. L. (1998). Staphylococcus aureus : A Well-Armed Pathogen, 1179–1181.
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas, 2(3), 119–145.
- Ávila Castañeda, I. M. (2009). Estudio de los compuestos polifenólicos, con énfasis en flavonoides, del hongo *Lentinula edodes* y determinación de la actividad antioxidante.
- Barrientos, I. (2016). Caracterización Físicoquímica y Evaluación del rendimiento de aceite fijo de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) a escala laboratorio utilizando los métodos de maceración estática y maceración dinámica con reflujo. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Brizuela, M. A., García, L., & Pérez, L. (1998). Basidiomicetos : nueva fuente de metabolitos secundarios, 69–74.



- Calderone, R., & Fonzi, W. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327–35.
- Castillo-Machalskis, I., D'armas, H., Centeno, S., & Núñez, M. (2009). Actividad antifúngica de extractos crudos de hongos marinos aislados de raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.), 40(1).
- Chan, P., Thomas, G. N., & Tomlinson, B. (2002). Protective effects of trilinolein extracted from panax notoginseng against cardiovascular disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(12), 1157–1162. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466054>.
- Chiocchio, V., & Matković, L. (2011). Determination of Ergosterol in Cellular Fungi by Hplc a Modified Technique. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, 98(December), 10–15. Recuperado de: <http://aqa.org.ar/pdf98/98art2.pdf>.
- Choi, C. I., Lee, S. R., & Kim, K. H. (2015). Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of constituents from *Euonymus alatus* twigs. *Industrial Crops and Products*, 76, 1055–1060.
- Choppa, T., Selvaraj, C. I., & Zachariah, A. (2015). Evaluation and Characterization of Malabar Tamarind [*Garcinia cambogia* (Gaertn.) Desr.] Seed Oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5906–5913.
- Da Graça Sgarbi, D. B., Da Silva, A. J. R., Carlos, I. Z., Silva, C. L., Angluster, J., & Alviano, C. S. (1997). Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, 139(1), 9-14.
- Daba, A. S., & Ezeronye, O. U. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 672-678.
- Davda, R. K., Stepniakowski, K. T., Lu, G., Ullian, M. E., Goodfriend, T. L., & Egan, B. M. (2000). Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension*, 26(5), 764-770.
- Deng, L. L., Alexander, A. A., Lei, S., & Anderson, J. S. (2010). The cell wall teichuronic acid synthetase (TUAS) is an enzyme complex located in the cytoplasmic membrane of *Micrococcus luteus*. *Biochemistry Research International*, 2010.
- Díaz, B. (2015). Composición química y antioxidantes en setas comestibles.

- Díaz, P., Rodríguez, M., & Zhurbenko, R. (2010). Fundamental features on the *Enterococcus* genus as a very important pathogen at present time. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Diez, V. A., & Alvarez, A. (2001). Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food chemistry*, 75(4), 417-422.
- El-Sharkawy, S., Yang, W., & Dostal, L. (2001). Microbial oxidation of oleic acid. *Applied and*, 58(7), 2116–2122. Recuperado de: <http://aem.asm.org/content/58/7/2116.short>.
- Enith, K., Blanco, J., & Maya, G. C. (2011). Vitamina D. *Medicina & Laboratorio*, 17(5–6), 211–246.
- Flores Tatiana, V., & Vargas Alvin, K. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594–2598. Recuperado de [http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280\\_2.pdf?sequence=1](http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequence=1)
- García-hernández, A. M., García-vázquez, E., Hernández-torres, A., Ruiz, J., & Yagüe, G. (2011). Bacteriemias por *E. coli* BLEA: significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*, 24(2), 57–66.
- Gutiérrez, S., Casqueiro, J., & Martín, F. (2000). Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios, 54–60.
- Haselwandter, K., Ha, G., Ganzera, M., Haas, H., & Nicholson, G. (2013). Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal Basidiomycota *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*, 969–979.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 9(10), 486–493.
- Juárez. L. (2013). “Estudio Químico de una Cepa Comercial del Hongo *Pleurotus* sp. Universidad Veracruzana.
- Kennedy, M. J., Reader, S. L., & Davies, R. J. (1993). Fatty-Acid Production Characteristics of Fungi with Particular Emphasis on Gamma-Linolenic Acid Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(5), 625–634.

- Kim, D. H., Jung, S. J., Chung, I. S., Lee, Y. H., Kim, D. K., Kim, S. H., Baek, N. I. (2005). Ergosterol peroxide from flowers of *Erigeron annuus* L. as an anti-atherosclerosis agent. *Archives of Pharmacal Research*, 28(5), 541–5.
- Kim, D. S., Baek, N. I., Oh, S. R., Jung, K. Y., Lee, I. S., Kim, J. H., & Lee, H. K. (1997). Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Archives of Pharmacal Research*, 20(3), 201–205.
- Kim, S. E., Hwang, B. S., Song, J. G., Lee, S. W., Lee, I. K., & Yun, B. S. (2013). New bioactive compounds from Korean native mushrooms. *Mycobiology*, 41(4), 171–176.
- Kimura Y, Kido T, Takaku M, Sumiyoshi M, Baba K. (2004). Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: Its antitumor and antimetastatic actions. *Cáncer Science*, 95(9): 758-764
- Kind, T., & Fiehn, O. (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, 2(1), 23–60.
- Krishna De, B., & Verma, S. (2011). Characterization of lipids and fatty acids of the soil derived fungus &Cladosporium sp.&; *Grasas Y Aceites*, 62(2), 213–220.
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos, (January), pág. 13.
- Kusano, M., Fukushima, A., Fujita, N., Okazaki, Y., Kobayashi, M., Oitome, N. F., Saito, K. (2012). Deciphering starch quality of rice kernels using metabolite profiling and pedigree network analysis. *Molecular Plant*, 5(2), 442–451.
- León, J., Aponte, J. J., Rojas, R., Cuadra, D., Ayala, N., Tomás, G., & Guerrero, M. (2011). Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica*, 28(2), 237–246.
- Leotta, G. A., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I. C., Motter, M., & Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista argentina de microbiología*, 37(1), 1-10.

- Liébana, J. (2002). Microbiología Oral (2.a edición). Aravaca (Madrid): McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U.
- López, J. (2008). Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.
- Márquez-Fernández, O., Juárez Pacheco, L., & Trigos, Á. (2014). Aislamiento e identificación de esteroides de una cepa comercial de *Pleurotus sp.* Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente, 20(2), 227–235.
- Martínez, M. (2016). Ergosterol from the mushroom *Laetiporus sp.*; Isolation and structural characterization. *Revista Boliviana de Química*, 32(4).
- Mora, M. (2010). Determinación estructural de los metabolitos Secundarios triterpenoidales en búsqueda de Antimicrobianos de un hongo silvestre Aphylophoral colombiano. Departamento de Química, Magister e (3791), 97.
- Moreira, T. S., de Sousa, V. P., & Pierre, M. B. R. (2010). A novel transdermal delivery system for the anti-inflammatory lumiracoxib: influence of oleic acid on in vitro percutaneous absorption and in vivo potential cutaneous irritation. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 621–9.
- Nam, K. S., Jo, Y. S., Kim, Y. H., Hyun, J. W., & Kim, H. W. (2001). Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*, 69(2), 229–237.
- Nes & Zhou, 2009. (2009). Terpenoids: Higher, 1–13.
- Olea Delfina. (2006). Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH.
- Otálvaro S., Mariscal J., Hernández, N. (2011). Cuantificación por HPLC de cafeína y Ergosterol en el Hongo *Pleurotus albidus*. Memorias del V Simposio Internacional de Biofábricas.
- Paíno, O. (2007). Hongos Comestibles de la República Dominicana (Primera Ed). Santo Domingo, República Dominicana.

- Pérez, M., & Mota, M. (2010). Morfología y estructura bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 1–9. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>.
- Pérez, P. (2015). Biodiversidad e importancia de los hongos en el trópico Ecuatorial. Loja.
- Pontón, J., Moragues, M., Gene, J., Guarro, J., & Quindos, G. (2002). Hongos y actinomicetos alérgicos (Primera ed). Bilbao, País Vasco, España: Revista Iberoamericana de Micología.
- Popa, F., Rexer, K. H., Donges, K., Yang, Z. L., & Kost, G. (2014). Three new *Laccaria* species from Southwest China (Yunnan). *Mycological Progress*, 13(4), 1105–1117.
- Popoff, O., & Ferraro, L. (2002). Hongos y líquenes del macrosistema Iberá. Argentina.
- Prada, L., & Vega, P. (2008). Caracterización y evaluación de actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hongos de la familia Tricholomataceae frente a agentes causales de dermatomicosis en animales. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
- Quiriz, F. (2012). Evaluación de las Propiedades Antioxidantes Y Antimicrobiana de dos Especies del Hongo Medicinal Ganoderma Nativo de México y su contribución al Desarrollo Regional. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- Ragasa, C., Ebajo V., Reyes, R., Brklja, R., & Urban, S. (2015). Sterols and Lipids from *Pleurotus florida*. *Der Pharma Chemical*, 7, 331–336.
- Rendón, G. (2015). Caracterización y cultivo de diferentes recursos genéticos de hongos y su importancia en el desarrollo regional de la zona central de México. Colegio de postgraduados.
- Rivera, A., Nieto, I. J., & Valencia, M. a. (2012). Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de 1 fracción, (2), 95–102.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., & Bille, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(8), 2404-2412.

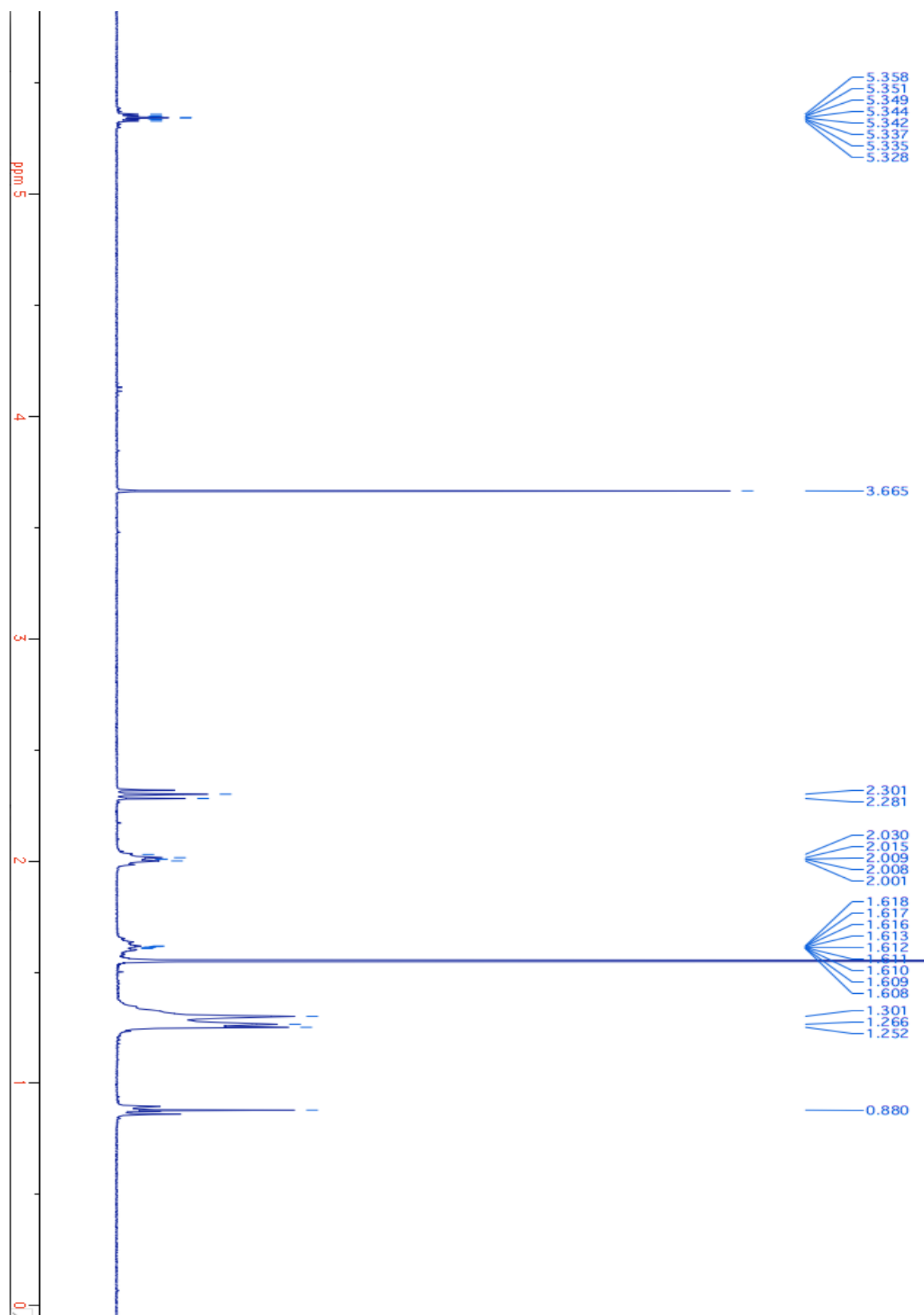
- Segovia, L. (2017). Escuela superior politécnica de Chimborazo extracto etanólico obtenido de *Ganoderma Lucidum* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*.
- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (vol. 78).
- Sheedy, E. M., Howlett, B. J., & May, T. W. (2013). Multigene sequence data reveal morphologically cryptic phylogenetic species within the genus *Laccaria* in southern Australia, 105(3), 547–563.
- Staadén, S. (2010). The role of fungal secondary metabolites in Collembola—fungi interactions. Technische Universitat.
- Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., & Wang, Y. (2013). Rapid screening and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography*, 27(2), 148–155.
- Urrutia, E. (2010). Extracción, separación y caracterización cualitativa de componentes químicos en el cuerpo fructífero de *Pholiota nameko* y evaluación de actividad antimicrobiana. Universidad Austral de Chile.
- Vacárcel, M. Cárdenas, S. 2000. Automatización y Miniaturización en Química Analítica. Barcelona-España: Springer-Verlag Ibérica Editorial.
- Volont, G., & Quiroga, P. (2013). Análisis farmacéutico (Primera ed). Buenos Aires, Argentina: 25 de octubre.
- Wang J F, Huang M J, Fang W L, Xie W L, Su W J, Zhao Y F. (2004). 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -Epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (Ergosterol Peroxide) Methanol solvate. *Acta Cryst.*, 60 (5):764-76.
- Whelan, J. (2008). The health implications of changing linoleic acid intakes. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3–5), 165–167.
- Won, S. R., Hong, M. J., Kim, Y. M., Li, C. Y., Kim, J. W., & Rhee, H. I. (2007). Oleic acid: An efficient inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Letters*, 581(25), 4999–5002.

- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch – iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 362(MAY 2006), 146–148.
- Yimo, B. L., Agi, F. Y., & Inami, Y. M. (2011). Primary structure and specificity of a new member of galectin family from the amethyst deceiver mushroom *Laccaria amethystina*, 75(1), 62–69.
- Yusso, S., Yutaka, T., & Minoru, T. (2001). Chemical constituents of inonotus obliquus IV. Triterpene and Steroids from cultured myceli.
- Zak, A., Vecka, M., Tvrzicka, E., Hruby, M., Novak, F., Papezova, H., Stankova, B. (2005). Composition of plasma fatty acids and non-cholesterol sterols in anorexia nervosa. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 54(4), 443–451.
- Zhang, H., Firempong, C. K., Wang, Y., Xu, W., Wang, M., Cao, X., Xu, X. (2016). Ergosterol-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles with enhanced in vitro antitumor activity and oral bioavailability. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(6), 834–844.
- Zhang, J., Li, T., Yang, Y., Liu, H., & Wang, Y. (2014). Arsenic Concentrations and Associated Health Risks in *Laccaria* Mushrooms from Yunnan (SW China).
- Zhou, S., Zhang, W., Li, Z., Miao, X., Zhang, F., Zehner, S., Valan Arasu, M. (2005). Comprehensive investigation of marine actinobacteria associated with the sponge *halichondria panicea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 63.

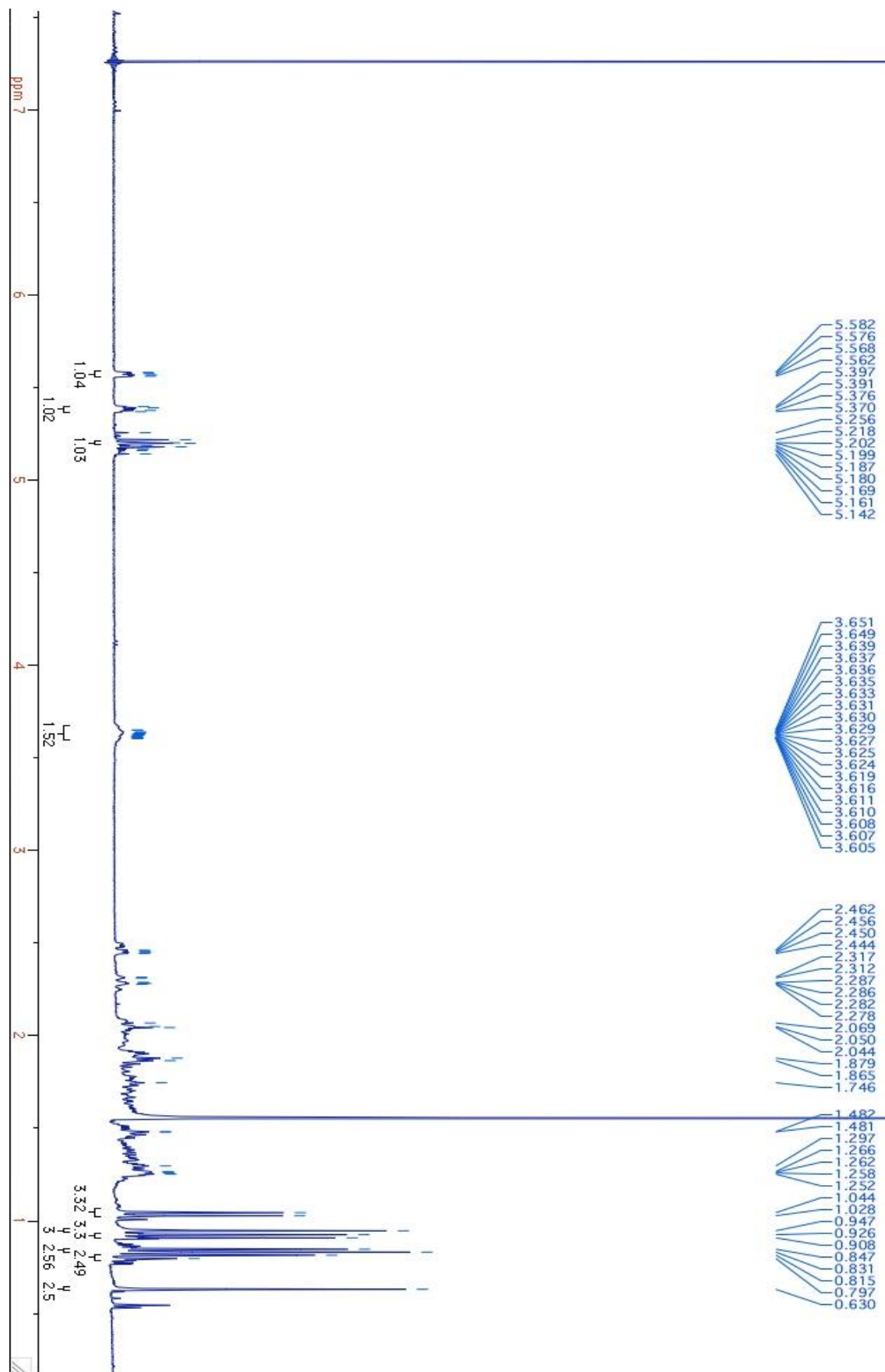
## **ANEXOS**



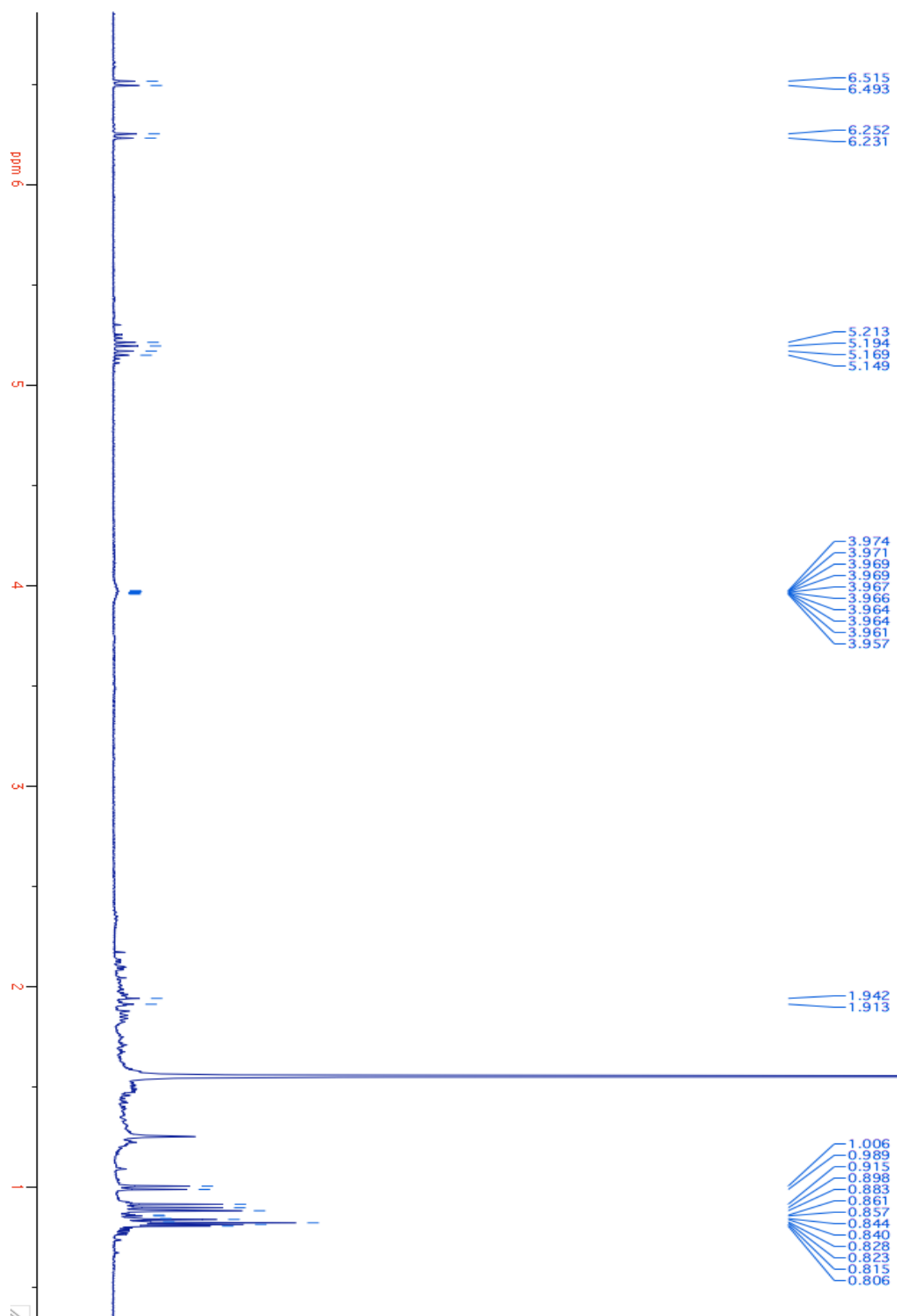
**Anexo 1.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Ácido oleico metil éster ( $^1\text{H}$ , 400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



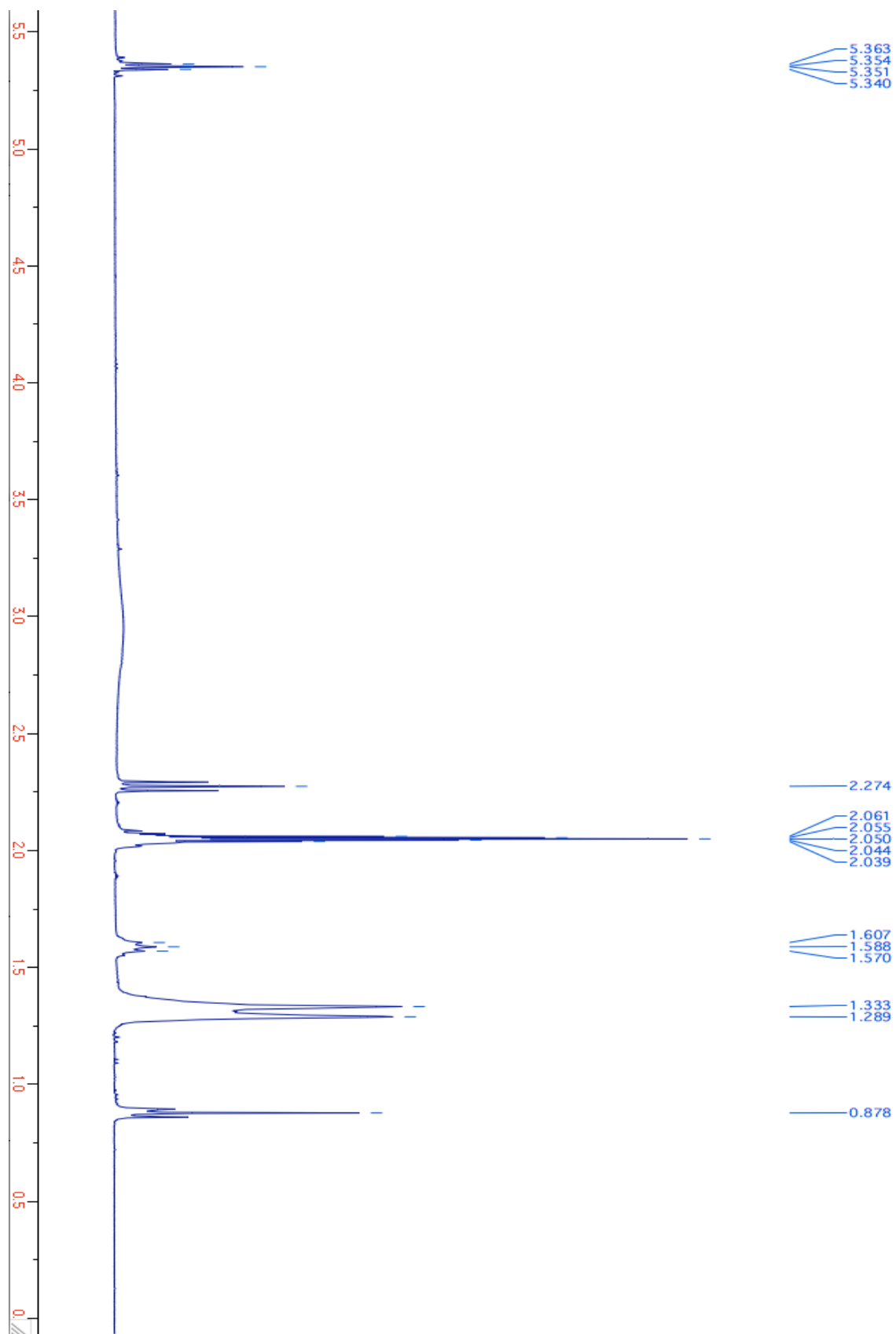
Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Ergosterol ( $^1\text{H}$ , 400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Anexo 3.** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Peróxido de Ergosterol ( $^1\text{H}$ , 400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



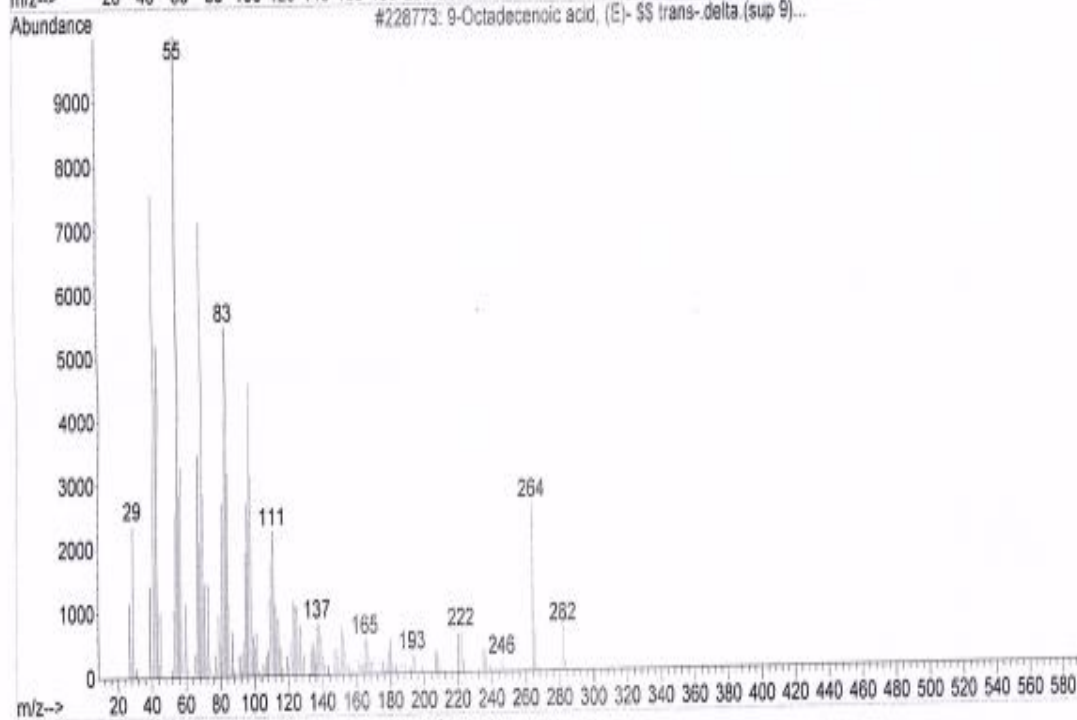
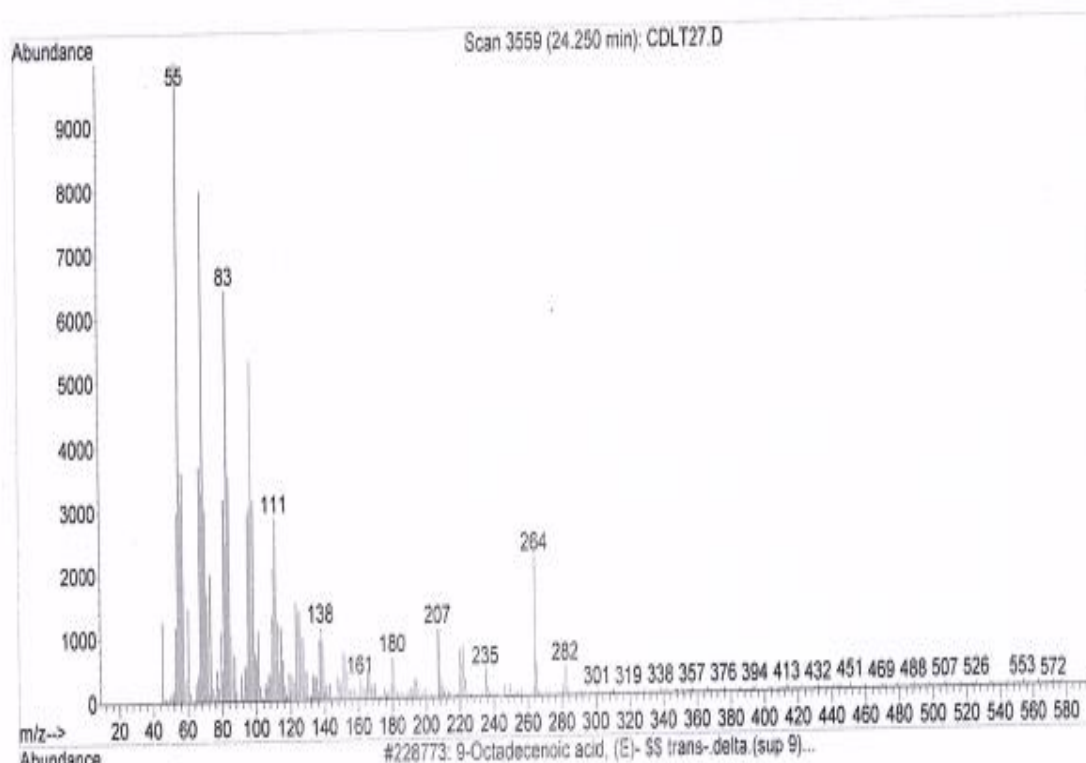
#### Anexo 4. Espectros de RMN y CG-EM del Ácido oleico.



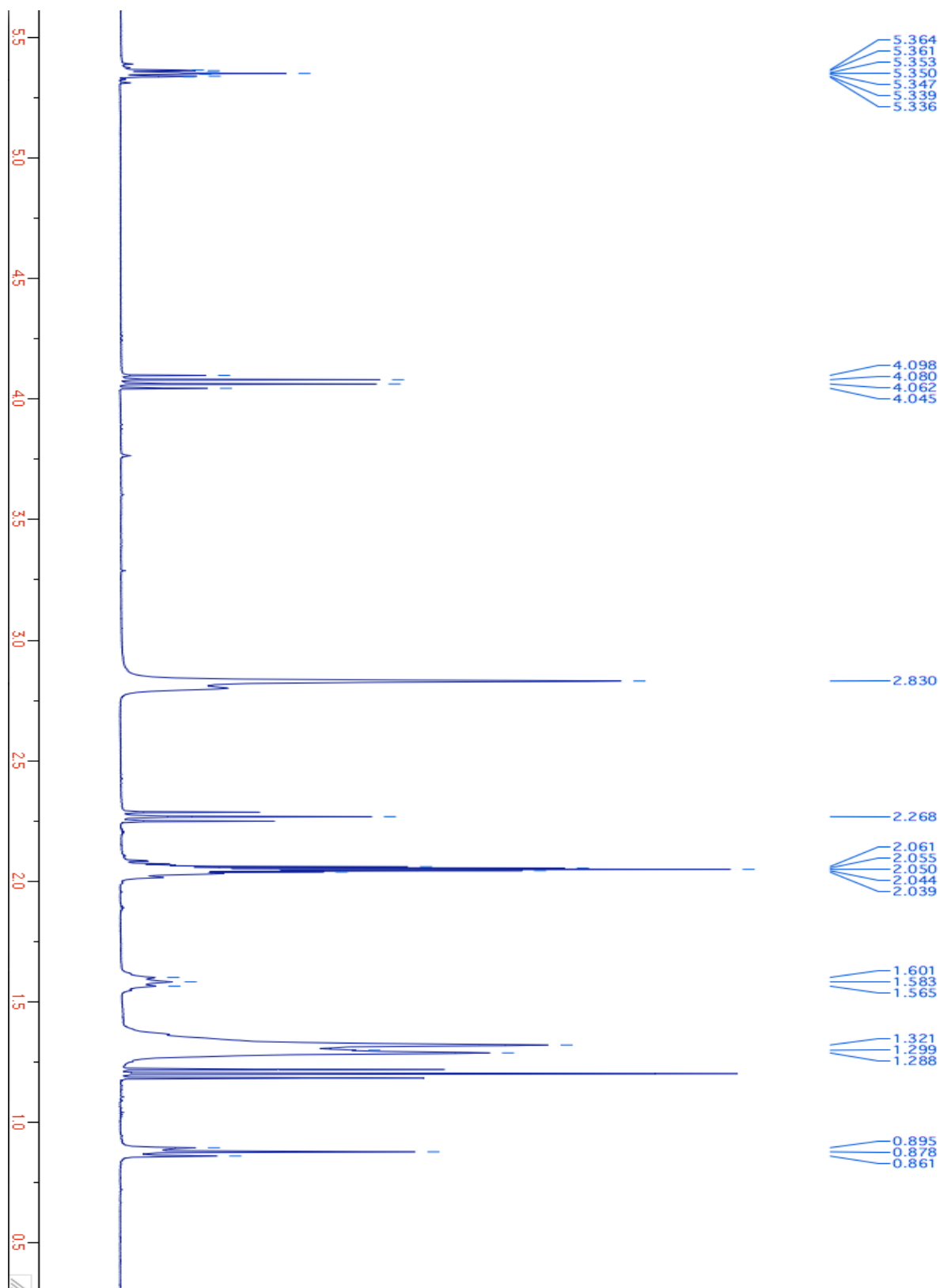
Library Searched : C:\DATABASE\wiley7n.l

Quality : 99

ID : 9-Octadecenoic acid, (E)- \$\$ trans-delta.(sup 9)-Octadecenoic acid \$\$ trans-delta.9-Octadecenoic acid \$\$ trans-Octadec-9-enoic acid \$\$ trans-Oleic acid \$\$ trans-9-Octadecenoic acid \$\$ Elaidic acid



### Anexo 5. Espectros de RMN y CG-EM del Ácido linoleico etil éster



Library Searched : C:\DATABASE\wiley7n.l  
Quality : 99  
ID : Ethyl Oleate

