



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Estudio químico y actividad biológica del hongo *Ganoderma cf. applanatum*
Pers. Pat. en la región Sur del Ecuador**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Solórzano Orellana, Yoselyn Michelle

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 DE 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 *Ganoderma cf. applanatum* Pers. Pat. En la región Sur del Ecuador**, realizada por Solórzano Orellana Yoselyn Michelle, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre del 2017

f).....

DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Solórzano Orellana Yoselyn Michelle declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Estudio químico y actividad biológica del hongo *Ganoderma cf. applanatum* Pers. Pat. En la región Sur del Ecuador, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo José Miguel Andrade Morocho 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: Solórzano Orellana Yoselyn Michelle
Cédula: 1105908071

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y salud y de esta manera haberme permitido llegar a culminar con éxito una nueva etapa de mi vida.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica como de la vida y sobre todo por brindarme su apoyo en cada momento.

A mis amigas por su apoyo incondicional y sobre todo por brindarme su cariño y amistad.

Yoselyn Michelle Solórzano Orellana

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles y por brindarme una vida llena de aprendizaje y experiencias.

A mis padres y hermanos que día a día me brindaron su amor y apoyo en esta etapa de mi vida y por darme la oportunidad de estudiar esta carrera.

A mis amigas por creer y confiar en mí y haber hecho de esta etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare.

A mi director de tesis M. Sc. José Miguel Andrade por compartir conmigo sus conocimientos, por su importante aporte, profesionalismo y por todas las enseñanzas brindadas.

Al Ph. D. Vladimir Morocho por su valiosa guía, asesoramiento, por su tiempo, amistad y por los conocimientos impartidos.

Finalmente al Departamento de Química y Ciencias Exactas por la oportunidad de realizar mi tesis y por brindarme el asesoramiento en la realización de este proyecto de investigación.

Yoselyn Michelle Solórzano Orellana

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Antecedentes	6
1.2 Hongos en el Ecuador.....	6
1.3 Reino Fungi.....	7
1.3.1 Hongos.....	7
1.3.2 Clasificación del Reino Fungi.....	8
1.4 Familia Ganodermataceae	9
1.5 Descripción del género <i>Ganoderma</i>	9
1.6 Descripción de la especie <i>Ganoderma cf. applanatum</i> Pers. Pat.....	9
1.6.1 Clasificación taxonómica.....	10
1.7 Metabolitos secundarios de los hongos.....	11
1.7.1 Clasificación de metabolitos secundarios.....	11
1.7.1.1 Terpenos.....	11
1.7.1.2 Compuestos Fenólicos.....	11
1.7.1.3 Glicósidos.....	12
1.7.1.4 Alcaloides.....	12
1.8 Técnicas de separación, purificación e identificación de metabolitos secundarios.....	12
1.8.1 Maceración.....	13
1.8.2 Cromatografía de columna.....	13

1.8.3	Cromatografía en capa fina.....	13
1.8.4	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).....	14
1.8.5	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	14
1.9	Actividad Biológica	14
1.9.1	Bacterias Gram Positivas.....	15
1.9.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.9.1.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	15
1.9.1.3	<i>Micrococcus luteus</i>	15
1.9.2	Bacterias Gram Negativas.	15
1.9.2.1	<i>Escherichia coli</i>	15
1.9.3	Levaduras.	16
1.9.3.1	<i>Candida albicans</i>	16
1.10	Enzima α-glucosidasa	16
CAPÍTULO 2		17
MATERIALES Y MÉTODOS		17
2.1	Esquema metodológico	18
2.2	Recolección del hongo.....	18
2.3	Obtención de Extractos Totales	19
2.4	Cromatografía de capa fina (CCF).....	20
2.5	Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Acetato	20
2.5.1	Purificación de la fracción FG6.....	21
2.5.2	Purificación de la fracción FG5.....	22
2.6	Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Metanol.....	23
2.6.1	Purificación de la fracción FGM6.....	25
2.7	Identificación de compuestos.....	26
2.7.1	Resonancia Magnética Nuclear.....	26
2.7.2	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.....	26
2.8	Determinación de la actividad biológica de los extractos	26
2.8.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.	26
2.8.2	Microorganismos de prueba.	26
2.8.3	Preparación de la muestra.	27
2.8.4	Preparación del cultivo overnight.	27
2.8.5	Preparación de la suspensión del inóculo para microorganismos.....	27

2.8.5.1	<i>Inóculo para bacterias</i>	27
2.8.5.2	<i>Inóculo para levaduras</i>	27
2.9	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	28
2.9.1	Concentración mínima inhibitoria antimicrobiana.	28
2.10	Actividad enzimática	28
2.10.1	Ensayo de α -glucosidasa.	28
CAPÍTULO 3	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1	Extractos obtenidos de <i>Ganoderma applanatum</i>	31
3.2	Compuestos aislados de <i>Ganoderma applanatum</i>	31
3.3	Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo	31
3.3.1	Compuesto 1.	31
3.3.2	Compuesto 2.	32
3.4	Fraccionamiento del extracto de Metanol	34
3.4.1	Compuesto 3.	34
3.5	Determinación de la actividad biológica de los extractos	35
3.5.1	Actividad antimicrobiana	35
3.6	Actividad enzimática de extractos totales	36
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Ganoderma applanatum</i>	10
Tabla 2. Fracciones obtenidas del extracto total de Acetato de Etilo	21
Tabla 3. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción FG6	22
Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto total de Metanol	25
Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos de AcOEt y MeOH	31
Tabla 6. Compuestos aislados de <i>Ganoderma applanatum</i>	31
Tabla 7. Datos espectroscópicos de ¹ H RMN del Ergosterol en CDCl ₃	33
Tabla 8. Datos espectroscópicos de ¹ H RMN del Peróxido de Ergosterol en CDCl ₃	34
Tabla 9. CMI antimicrobiana de los extractos totales de <i>G. applanatum</i>	36
Tabla 10. Efecto inhibidor de α-glucosidasa en extractos totales de <i>G. applanatum</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ganoderma applanatum</i>	10
Figura 2. Esquema de la metodología empleada	18
Figura 3. <i>Ganoderma applanatum</i>	18
Figura 4. Muestra triturada	19
Figura 5. Obtención de extractos totales: a) Filtración al vacío, b) Concentración, c) Extractos totales.	20
Figura 6. CCF de las fracciones FG1-FG9 (8:2 Hex/AcOEt)	21
Figura 7. CCF de la fracción FG3: 47-61 (6:4 Hex/AcOEt)	22
Figura 8. CCF de la fracción FG5: 33-36 (8:2 Hex/AcOEt)	23
Figura 9. Columna cromatográfica del extracto de Metanol.....	23
Figura 10. CCF de las fracciones (FGM1-FGM9): a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm, c) Placa revelada	24
Figura 11. CCF de la fracción FGM5: 37-55 (5:5 Hex/AcOEt)	25
Figura 12. Estructura química del Ácido Mirístico.....	31
Figura 13. Estructura química del Ergosterol.....	32
Figura 14. Estructura química del Peróxido de Ergosterol.....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro CG-EM del ácido mirístico.....	48
Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Ergosterol (¹ H, 400MHz, CDCl ₃)	49
Anexo 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Peróxido de Ergosterol (¹ H, 400MHz, CDCl ₃)	50

RESUMEN

En el presente estudio se aisló e identificó metabolitos secundarios de los extractos de acetato de etilo y metanol del hongo *Ganoderma applanatum* mediante técnicas espectroscópicas RMN y CG-EM. Se identificaron 3 compuestos conocidos como ácido mirístico, ergosterol y peróxido de ergosterol. La actividad antimicrobiana se determinó mediante concentración mínima inhibitoria (CMI). Los extractos de acetato de etilo y metanol fueron inactivos contra los microorganismos utilizados en el ensayo. Finalmente se evaluó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de los extractos totales. El extracto de Acetato de etilo presenta una actividad inhibitoria relativamente buena con un valor de IC_{50} de 27,81 μ g/mL, mientras que el extracto de Metanol presenta una actividad inhibitoria baja con un valor de IC_{50} de 215,41 μ g/mL.

Palabras claves: *Ganoderma applanatum*, ácido mirístico, ergosterol, peróxido de ergosterol, α -glucosidasa, CMI.

ABSTRACT

In the present study was isolated and identified secondary metabolites of ethyl acetate and methanol extracts from the fungus *Ganoderma applanatum* through spectroscopic techniques GC-MS and NMR. We identified 3 compounds known as myristic acid, ergosterol and ergosterol peroxide. The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC). The extracts in ethyl acetate and methanol were inactive against the tested microorganisms strains. Finally, we evaluated the inhibitory activity of α -glucosidase of total extracts. The extract in ethyl acetate has a relatively good inhibitory activity with an IC_{50} of 27,81 $\mu\text{g/mL}$, while the methanol extract has a low inhibitory activity with an IC_{50} of 215,41 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Ganoderma applanatum*, myristic acid, ergosterol, ergosterol peroxide, α -glucosidase, CMI.

INTRODUCCIÓN

Entre los organismos del suelo, el Reino Fungi representa un elemento principal de la biomasa total del suelo (Ruiz, Rojas, & Sieverding, 2011). Posee una amplia diversidad biológica y cuenta con un aproximado de 1.5 millones de especies fungosas que se diferencian unas de otras por su gran variabilidad en morfología y ciclos de vida (Aguirre, Ulloa, Aguilar, Cifuentes & Valenzuela, 2014).

Los hongos producen diversas clases de metabolitos secundarios con estructura única y con sustancias bioactivas, demostrando importantes efectos biológicos, tales como: antioxidantes, anticancerígenos, antidiabéticos y antiinflamatorios. Cabe destacar que los polisacáridos, incluyendo β -glucano, son considerados como los principales componentes responsables de la actividad biológica de los hongos (Kim *et al.*, 2013).

Ganoderma, es un hongo que crece sobre parques de árboles que causan la putrefacción blanca (Khaled *et al.*, 1995). Según investigaciones realizadas se han encontrado diversos grupos de compuestos químicos como: triterpenos, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, nucleótidos, alcaloides, esteroides, lactonas, ácidos grasos y enzimas. Cabe destacar que este hongo posee varias propiedades medicinales útiles para varios tipos de enfermedades, como: hepatitis, nefritis, asma, hipertensión, diabetes, artritis y migraña. También posee efectos antitumorales, antihistamínicos, antialérgicos, antioxidantes e inmunomoduladores (Boh, Hodžar, Dolničar, Berovič, & Pohleven, 2000).

Se estima que existen 250 especies de *Ganoderma* a nivel mundial, de las cuales por estudios realizados 17 especies se han encontrado en el Ecuador, aportando a la diversidad de este género, a la contribución de la familia Ganodermataceae y al reino fungi en el Ecuador. Sin embargo, es poco lo que se conoce del género *Ganoderma*, ya que hasta el momento han sido solamente analizadas en cepas extranjeras, desconociendo su potencial medicinal (Salazar, 2014).

Ganoderma applanatum pertenece a la familia Ganodermataceae. Es una especie distintiva en relación con los otros miembros del género. Tiene interesantes compuestos químicos para ser extraídos, purificados e identificados (Khaled *et al.*, 1995). Estos compuestos tiene una inhibición muy potente (Lee *et al.*, 2006) y algunos de ellos muestran citotoxicidad contra células de hepatoma entre ellos algunos triterpenos (Ming *et al.*, 2002).

Por los antecedentes antes mencionados la presente investigación tiene como finalidad aislar e identificar compuestos con posible actividad terapéutica a partir de extractos del hongo *Ganoderma applanatum* en la región Sur del Ecuador.

CAPÍTULO 1
MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Desde la prehistoria los hongos han sido considerados como el medio más importante para contrarrestar ciertas enfermedades en sus poblaciones (Trutmann & Luque, 2012). De esta manera el ser humano se ha preocupado por su bienestar y gran parte lo ha encontrado en la naturaleza. Por lo tanto, mediante su conocimiento, los hongos han formado parte fundamental de la salud y alimentación humana, ya que se sabe que los primeros mexicanos usaban preparaciones derivadas de hongos para acelerar la cicatrización de heridas, de igual modo en China y Japón los hongos han sido la base de su medicina tradicional. Es a partir de este conocimiento que surge el interés por generar conocimiento científico acerca de los hongos, desarrollando de esta manera métodos para la extracción, fraccionamiento y purificación de diversas sustancias de los basidiocarpos y de los micelios de numerosas especies de hongos (Quiriz, 2012).

Su empleo con fines curativos es una práctica medicinal de diversos pueblos, lo que ha ocasionado que se profundice en el conocimiento y aislamiento de extractos o compuestos responsables de la actividad medicinal. Por lo tanto existen abundantes recursos genéticos de hongos comestibles y funcionales, por la cual se debe fortalecer su conservación, estudio y utilización (Rendón, 2015).

1.2 Hongos en el Ecuador

El Ecuador es considerado como uno de los lugares más biodiversos del planeta, se estima una riqueza aproximada de 100000 especies de macrohongos, pero únicamente han sido registrados 3766 especies (Andrade, Malagón, Piepenbring, & Armijos, 2012). Sin embargo, a pesar de que han realizado algunos estudios en la zonas de Pichincha, Quito, Yasuní o Cuyabeno, poco se sabe de lo que hay en el país, debido a que es poca la atención que se le ha otorgado a este grupo de organismos lo que hace evidente la necesidad de contar con más investigaciones científicas dedicados al estudio de estos organismos (Salazar, 2014).

En la actualidad, Ecuador tiene algunos proyectos que están favoreciendo la investigación en micología, con el fin de dar iniciativas que sirvan como incentivo para que la explotación de estas especies se conviertan en una fuente segura de alimentación para poblaciones marginales y de esta manera se considere una buena señal para el desarrollo de la micología (Salazar, 2014).

1.3 Reino Fungi

El reino Fungi agrupa a un inmenso número de individuos distribuidos en una gran diversidad de especies (Aguirre-Acosta, Ulloa, Aguilar, Cifuentes, & Valenzuela, 2014). Presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Entre los organismos que lo conforman están setas, royas, trufas, mohos y levaduras (Montes, Restrepo & McEwen, 2003). Actualmente, existe alrededor de 1.5 millones de especies de hongos en el mundo, de las cuales unas 70 000 están descritas, es decir, apenas se conoce el 1,4% de hongos a nivel mundial (Salazar, 2014).

1.3.1 Hongos.

Los hongos desarrollan un papel importante en el mantenimiento de la biosfera por lo que son el segundo grupo más abundante en el mundo. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y se estima que existen aproximadamente un millón y medio de especies, contribuyendo de esta manera a la descomposición de la materia orgánica (Popoff & Ferraro, 2002; Pontón *et al.*, 2002). Son un grupo independiente al igual que las plantas y los animales y su clasificación se basa principalmente en su morfología y en las características de reproducción (Montes, Restrepo & McEwen, 2003).

Los hongos son organismos eucariotas que no poseen flores, hojas, clorofila ni celulosa, pero si tienen una pared celular que está constituida por quitina. Su reproducción tanto sexual como asexual se da por medio de esporas y viven sobre restos orgánicos de donde toman su alimento. Por lo tanto han ido evolucionando como un grupo completamente distinto de las plantas y los animales, sobre todo por la presencia de ergosterol en la membrana citoplásmica (Popoff & Ferraro, 2002; Aguirre *et al.*, 2014).

Al estar ausentes los pigmentos fotosintéticos, los hongos obtienen los nutrientes por absorción, es decir lo obtienen por digestión extracelular gracias a su actividad secretora de enzima (Naranjo, 2014). Tienen un metabolismo quimio heterótrofo, debido a que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos que son sintetizados por otros organismos, condicionando de esta manera su modo de vida, ya que en la naturaleza están asociados a la materia orgánica en descomposición (Pontón, Moragues, Gene, Guarro & Quindos, 2002).

Finalmente los hongos han tenido un papel importante en la historia económica del hombre como alimento y medicina, ya que de ellos se extraen ácidos, vitaminas, enzimas, proteínas y hormonas. Por lo tanto es un recurso valioso ya que aporta nutrientes y metabolitos

secundarios altamente bioactivos, de interés en medicina y en biotecnología (Naranjo, 2014; Guarro, 2012).

1.3.2 Clasificación del Reino Fungi.

Debido a varios estudios entre ellos estructurales, bioquímicos y en especial de biología molecular, la clasificación de los hongos ha ido cambiando frecuentemente, sin embargo en la mayoría de investigaciones se reconocen solo 4 divisiones *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota*, (Ponton, Moragues, Gene, Guarro & Quindos, 2002).

Ascomycota: es el más extenso y comprende el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos. Posee cuerpos fructíferos y aunque tiene una gran variedad de formas, generalmente los más llamativos tienen forma de pequeñas copas (Popoff & Ferraro, 2002). Su reproducción puede ser sexual o asexual. Asexual cuando el mecanismo de reproducción es directamente la formación de esporas (llamados conidios) y no se forma un cuerpo fructífero. Mientras que en la reproducción sexual se forma un tejido fértil en el cuerpo fructífero originando células con forma de bolsa llamadas ascos (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

Basidiomycota: son hongos sombreros y su importancia radica en que tienen actividad saprófita que los hace actuar como descomponedores, principalmente de la sustancia leñosa (celulosa y lignina). Gran mayoría de las especies viven en árboles muertos en pie o en el suelo, sobre ramas caídas y productos maderables. También actúan tanto como verdaderos patógenos, provocando enfermedades en árboles vivos hasta matarlos (Popoff & Ferraro, 2002).

Chytridiomycota: hongos acuáticos que viven en arroyos, lagunas y lagos como en suelos anegados o en medios ácidos. Pueden ser parásitos de algas como de saprófitos de insectos y plantas en descomposición. Son unicelulares y se caracterizan por ser el único grupo que posee células móviles con un solo flagelo en algún estadio de su ciclo de vida (Sobrado, Cabral, Romero, 2013).

Zygomycota: está formado por hifas cenocíticas, las mismas que están compuestas por quitina, quitosano y ácido poliglucorónico. Carecen de células flageladas y habitan tanto en plantas como animales muertos, así como en cualquier otra materia orgánica (estiércol). Pueden realizar tanto la reproducción asexual como la sexual, participando en ambas las esporas. Este hongo provoca muchos tipos de podredumbre indeseables en los alimentos y algunas enfermedades parasitarias en los animales. Se han identificado más de 600

especies tanto acuáticas como terrestres e incluso parásitas de vertebrados y humanos (Sobrado, Cabral, Romero, 2013).

1.4 Familia Ganodermataceae

La familia Ganodermataceae consta de cuatro géneros *Amauroderma*, *Ganoderma*, *Haddowia* y *Humphreya*, posee 117 especies y tienen una amplia distribución. Se caracteriza por poseer basidiosporas de doble pared, una capa exterior y una capa interior que se caracteriza por ser pigmentado, grueso y liso. Es una familia cosmopolita que causa pudrición blanca en su hospedero. Los hongos de esta familia son importantes porque incluyen especies con propiedades medicinales y porque participan en el ciclo de nutrientes de los ecosistemas, ya que son considerados degradadores de lignina de la naturaleza (Salazar, 2014; Naranjo, 2014).

1.5 Descripción del género *Ganoderma*

Ganoderma es un género con una distribución cosmopolita que se lo puede encontrar en zonas templadas como en los trópicos. Crecen en madera, generan descomposición y puede ser anuales o perennes. Este género produce una pudrición blanca que se basa en la degradación de los componentes de la pared celular de la madera, debido a que poseen enzimas extracelulares conocidas como enzimas modificadoras de lignina (Salazar, 2014; Ra *et al.*, 2016).

Además de actuar como agentes descomponedores, existen varias especies del género *Ganoderma* que son utilizadas por sus propiedades medicinales, por ejemplo: *G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. australe*, *G. capense*, entre otros, las mismas que biosintetizan sustancias para generar beneficios en la salud, tales como efectos antitumorales, inmunoreguladores, hepatoprotectores, antioxidantes, antibacteriales, etc (Salazar, 2014; Guzmán, Santa Fe, Salcedo, Angulo, & Torres, 2013).

A partir del género *Ganoderma*, se han aislado e identificado más de 180 sustancias químicas, entre las cuales están polisacáridos, triterpenos, nucleósidos, ergosteroles, ácidos grasos, proteínas/péptidos y oligoelementos, aislados del cuerpo fructífero, micelio y esporas (Naranjo, 2014).

1.6 Descripción de la especie *Ganoderma cf. applanatum* Pers. Pat.

Ganoderma applanatum también llamada la hierba omnipotente. Es un hongo medicinal valioso que está ampliamente distribuido en el mundo y se lo utiliza para tratar diversas

enfermedades como cáncer, diabetes, bronquitis, hepatitis, hipertensión, enfermedades inmunológicas y trastornos inmunológicos. También se ha revelado que tienen bioactividades muy significativas como antitumoral, inmunomodulador, antibacteriano, antiinflamatorio, antivirales y estimulante inmune. Sus metabolitos poseen una de las variedades tradicionales más conocidas lo que ha permitido el aislamiento de triterpenoides, esteroides, polisacáridos, proteínas y fenoles (Li *et al.*, 2016; Ra *et al.*, 2016) (Figura. 1).



Figura 1. *Ganoderma applanatum*
Fuente: Autora, 2017
Elaboración: Autora, 2017

1.6.1 Clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Ganoderma applanatum*

Reino	Hongos
División	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Polyporales
Familia	Ganodermataceae
Género	<i>Ganoderma</i>
Especie	<i>applanatum</i>
Nombre científico	<i>Ganoderma applanatum</i>

Fuente: (Naranjo, 2014)
Elaboración: (Naranjo, 2014)

1.7 Metabolitos secundarios de los hongos

Los hongos producen gran variedad de metabolitos secundarios que son de importancia para el hombre, tales como: antibióticos, ciclosporinas, alcaloides, compuestos antifúngicos, etc (Gutiérrez, Casqueiro, & Martín, 2000). Por lo tanto son compuestos que tienen estructura química muy diferente a los metabolitos primarios (Torrenegra & Baquero, 1999). Los metabolitos secundarios se distribuyen entre grupos taxonómicos y se caracterizan por sus diferentes aplicaciones como medicamentos, perfumes, insecticidas, entre otros. Sin embargo presentan una distribución restringida en el reino vegetal por lo que se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada en un determinado género de plantas, una familia o incluso a algunas especies. Los metabolitos secundarios se agrupan en 4 clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos & García, 2009).

1.7.1 Clasificación de metabolitos secundarios.

1.7.1.1 Terpenos.

Los terpenos denominados también terpenoides constituyen el grupo más numeroso y amplio de metabolitos secundarios, contando con la presencia de más de 40.000 moléculas diferentes. Son sustancias químicas que se derivan biosintéticamente del ácido mevalónico y que origina el isopentenil pirofosfato. Suelen ser insolubles en agua y la ruta biosintética de estos compuestos da lugar al crecimiento y supervivencia de los hongos. Se presentan en la naturaleza como pigmentos carotenoides, esteroides, aceites esenciales, etc (Ávalos & García, 2009).

Estos compuestos tienen importancia medicinal debido a sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobiana, etc (Ávalos & García, 2009).

1.7.1.2 Compuestos Fenólicos.

Los compuestos fenólicos o polifenoles son moléculas que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo. Se conocen aproximadamente 4000, siendo los flavonoides el grupo más importante (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014). Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina (Ávalos & García, 2009).

Los compuestos fenólicos participan en las funciones metabólicas de las plantas, su crecimiento y reproducción, así también en la protección contra patógenos externos. También son responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos (Peñarrieta et al., 2014).

Existen dos rutas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido malónico produce fenoles simples y algunas quinonas y están presentes en hongos y bacterias, mientras que la ruta del ácido shikímico conduce a la formación de los compuestos fenólicos de plantas, por lo que esta ruta se la encuentra en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Ávalos & García, 2009).

1.7.1.3 Glicósidos.

Los glicósidos o heterósidos son metabolitos vegetales de gran importancia, su nombre hace referencia al enlace glucosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Los más importantes son las saponinas, los antraquinónicos, los cianogénicos, los cardiotónicos y los cumarínicos. También se incluyen a los glucosinolatos debido a que tienen una estructura similar a los glicósidos (Ávalos & García, 2009).

1.7.1.4 Alcaloides.

Es una gran familia que contiene más de 15.000 metabolitos secundarios. Se sintetizan a partir de lisina, tirosina y triptófano, son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y poseen actividad biológica. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas. A dosis altas, son considerados muy tóxicos, mientras que a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante o analgésico (Ávalos & García, 2009).

1.8 Técnicas de separación, purificación e identificación de metabolitos secundarios

Para determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie *Ganoderma applanatum* se aplica una serie de técnicas tanto de extracción, separación, purificación y elucidación estructural.

1.8.1 Maceración.

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido el cual consiste en la extracción de los principios activos de un hongo o parte de ella a temperatura ambiente, utilizando como líquido solventes. Sin embargo se debe tomar en cuenta que la naturaleza de los compuestos obtenidos dependen tanto de la materia prima como del líquido usado para la extracción, así como también el contenido de humedad, tamaño de partícula, entre otros (Sharapin, 2000).

Este proceso se lo puede realizar de dos maneras, clásica o estática y dinámica. Estos métodos consisten en dejar en contacto la materia prima con el solvente por varios días con agitación ocasional. Aunque la diferencia radica en que el método dinámico utiliza agitación para homogeneizar la mezcla permitiendo de esta forma que el solvente alcance a cubrir mejor la materia prima. Este método puede ser combinado con la aplicación de calor para obtener un rendimiento mayor o reducir el tiempo extractivo (De León, 2016).

1.8.2 Cromatografía de columna.

La cromatografía en columna es un método físico de separación y purificación de diferentes compuestos. Este tipo de cromatografía se divide en dos fases una estacionaria (sílice gel) que se deposita en el interior de una columna de vidrio, la cual finaliza con una llave para controlar el paso de las sustancias y otra móvil (gas o líquido) que es la mezcla del adsorbente con la muestra. El solvente que se utilice es esencial para una buena separación de compuestos, pero depende de la afinidad diferencial de los mismos por la fase móvil o estacionaria (Rocha, 2000).

1.8.3 Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina, es una técnica rápida y sencilla que nos permite determinar la pureza de un compuesto, comparar muestras y sobre todo controlar las fracciones obtenidas por cromatografía en columna. Está basado en el principio de dos fases, una fase estacionaria (sílice gel) y otra fase móvil (solvente), donde las moléculas fluyen por capilaridad. Otra manera de cuantificar es a través del RF (factor de retención), el cual se lo obtiene de la relación entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia total recorrida por el disolvente (López, Méndez, Pérez, & Torres, 2012).

1.8.4 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

Es una técnica que permite separar, identificar y cuantificar compuestos volátiles y semivolátiles de mezclas complejas. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido en una técnica utilizada en los laboratorios químicos (Gutiérrez, Droguet, & Odeur, 2002).

Por lo tanto, la utilización de gases acoplada a un espectro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se tratan de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra para su análisis, por esta razón son compatibles. El único obstáculo que tiene es que cuando se realiza el acoplamiento, el efluente que sale de la columna cromatográfica lo realiza a presión atmosférica y este tiene que introducirse al interior del espectrómetro de masas que trabaja con un alto vacío. Cabe recalcar que el espectrómetro de masas además de proporcionar los espectros, también actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total, cuya representación gráfica es el cromatograma o "TIC" (Gutiérrez *et al.*, 2002).

1.8.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectral que se basa en las propiedades magnéticas que poseen algunos núcleos, principalmente en las propiedades del núcleo de hidrógeno, donde los electrones producen pequeñas modificaciones que dan lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento permitiendo el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas (Elguero, Alkorta, Pardo, Claramunt, & Santa, 2008).

Por lo tanto, el desarrollo alcanzado por esta técnica ha permitido cuantificar diferentes tipos de compuestos como biomoléculas de elevada complejidad (Garrido, Vélez, & Vélez, 2013).

1.9 Actividad Biológica

Se denominan enfermedades infecciosas a aquellas que son provocadas por microorganismos patógenos como bacterias, hongos, virus o parásitos. Estas enfermedades se manifiestan por la transmisión de una persona o animal infectados a un huésped susceptible, en forma directa o indirecta por medio de un huésped intermediario ya sea de naturaleza vegetal o animal (Chin, 2001).

1.9.1 Bacterias Gram Positivas.

1.9.1.1 *Staphylococcus aureus.*

Son cocos Gram positivos, no móviles cuyas colonias miden de 1 a 3 mm. No forman esporas y pueden encontrarse solos, en pares, en cadenas cortas o formando racimos de uvas.

Es una bacteria que se encuentra en la piel y en las membranas mucosas del hombre, causando gran variedad de enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones del SNC, osteomielitis, endocarditis, neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones nosocomiales (Bustos, Hamdan, & Gutiérrez, 2006).

1.9.1.2 *Enterococcus faecalis.*

Son cocos Gram positivos y anaerobios facultativos que se encuentran formando parte de la flora normal del tracto gastrointestinal humano y del tracto genital de la mujer. Esta bacteria tiene la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006). Están presentes en el agua y alimentos contaminados causando diferentes enfermedades como endocarditis, bacteriemia infecciones del tracto urinario, infecciones de piel y tejidos blandos (Díaz, Rodríguez, & Zhurbenko, 2010).

1.9.1.3 *Micrococcus luteus.*

Son esferas Gram positivas que pueden agruparse en pares, tétradas o en forma irregular. Son aerobios con metabolismo estrictamente respiratorio y crecen bien en ambientes con poca agua o con altas concentraciones de sal (Kocur, Kloos, & Schleifer, 2006). Son consideradas patógenas solo para individuos inmunosuprimidos, siendo relacionada la presencia de endocarditis (Atencio, Rivera, Aranaga, Navarro, & Guiñez, 2009).

1.9.2 Bacterias Gram Negativas.

1.9.2.1 *Escherichia coli.*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria forma parte de la flora normal del tracto intestinal del hombre y de algunos animales. Sin embargo existen cepas de *E. coli* que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diversas enfermedades (Rodríguez, 2002), entre ellas infección urinaria, septicemia, meningitis o enfermedad diarreica (Rivero, Padola, Echeverría, & Parma, 2004).

1.9.3 Levaduras.

1.9.3.1 *Candida albicans*.

Es un hongo unicelular que se encuentra asociado a seres vivos de sangre caliente. En el ser humano se encuentra como comensal en el tracto respiratorio, intestinal, vagina y mucosa bucal. También produce infecciones superficiales que afectan la piel, uñas y mucosas. La piel y las mucosas son lugares donde la candidiasis es frecuente (Mata de Henning & Perrone, 2001).

1.10 Enzima α -glucosidasa

La α -glucosidasa está presente en los seres vivos como en microorganismos, hongos, plantas y animales. Son enzimas encargadas de la degradación de los carbohidratos y se encuentran ubicadas en el epitelio del intestino delgado produciendo una ruptura de los disacáridos y carbohidratos complejos, facilitando su absorción (Hernández *et al.*, 2011). Los inhibidores de esta enzima son los únicos hipoglicemiantes orales no sistémicos que pueden ayudar en el manejo de la diabetes tipo 2. Entre los principales medicamentos de este grupo se encuentra la acarbosa (Chong & Herrera, 1994) que se utiliza principalmente para el tratamiento de la diabetes, la cual actúa disminuyendo las concentraciones postprandiales de glucosa (Escorcia, 2009). También está asociada en el tratamiento de varias patologías como: sobrepeso, acumulación de hidratos de carbono en el organismo, obesidad, cáncer colorrectal y sobre todo enfermedades cardiovasculares (Garrido, 2014).

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Esquema metodológico

En la figura 2 se muestra el esquema del desarrollo de la presente investigación.

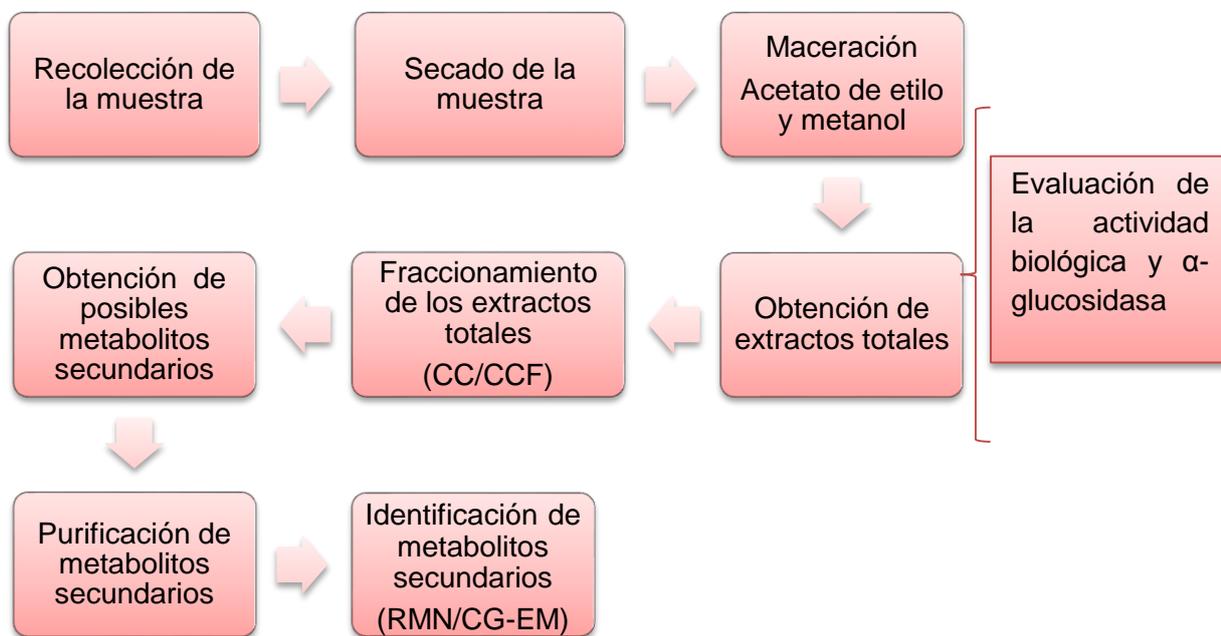


Figura 2. Esquema de la metodología empleada

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

2.2 Recolección del hongo

La recolección de la especie *Ganoderma applanatum* se realizó en el bosque Rinconada de Macará, de la ciudad de Loja (Ecuador), en el mes de febrero del 2016, a una temperatura promedio de 20°C a 25°C y una altura cercana a los 440 msnm, cuyas coordenadas geográficas son Sur: 04°22'58" y Oeste: 79°56'50" (Figura. 3). La muestra fue clasificada taxonómicamente por el Ph.D. Darío Cruz y una muestra fue depositada con voucher de colecta JMA056 en la sección de micología de la UTPL.



Figura 3. *Ganoderma applanatum*

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

El hongo recolectado se secó durante 5 días a una temperatura de 34°C, luego se trituro para su posterior estudio (Figura. 4).

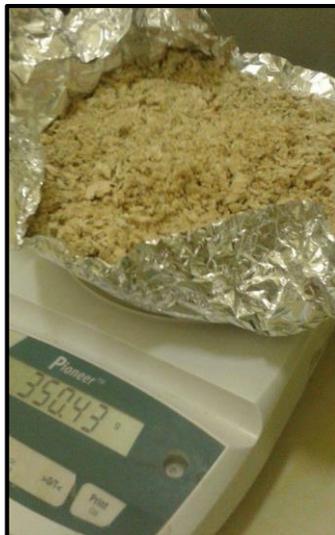


Figura 4. Muestra triturada
Fuente: Autora, 2017
Elaboración: Autora, 2017

2.3 Obtención de Extractos Totales

Los Extractos se obtuvieron a partir de 410g de material seco mediante la técnica de maceración estática, durante 24 horas utilizando disolventes de polaridad creciente, Acetato de Etilo y Metanol. El proceso de maceración se realizó por cinco veces con cada disolvente.

Luego se filtró y se concentró mediante rotaevaporación a presión reducida a una temperatura de 35°C hasta obtener los extractos tanto de acetato de etilo como de metanol (Figura. 5).

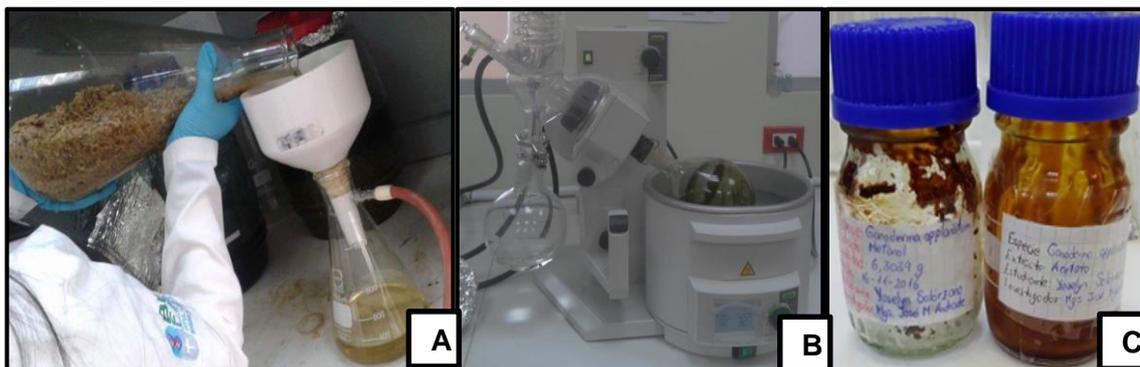


Figura 5. Obtención de extractos totales: a) Filtración al vacío, b) Concentración, c) Extractos totales.

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

2.4 Cromatografía de capa fina (CCF)

Una vez obtenidos los extractos totales, se realizó CCF (Cromatografía de Capa Fina) de cada extracto en diferentes polaridades para observar tanto la riqueza como separación de los metabolitos secundarios presentes en cada extracto, utilizando placas de Sílica gel 60 F254 (fase directa) y una combinación de solventes en diferentes proporciones. Luego las placas fueron visualizadas en UV a longitudes de onda de 254nm y 360nm. Finalmente fueron reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

2.5 Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Acetato

Para el fraccionamiento del extracto total de Acetato de Etilo se procedió a realizar en una relación 1:100 extracto: Sílica, pesando 2g de extracto en 200g de Sílica gel (Merck 0.0015-00) fase directa. Se eluyó con polaridad creciente iniciando con Hexano y AcOEt en relación 9:1, hasta AcOEt 100%. Al haber culminado todo el proceso del fraccionamiento del extracto total del AcOEt se realizó CCF con todas las fracciones obtenidas en fase directa, para ello se utilizó una mezcla de Hex:AcOEt en relación 8:2 (v/v). Para la visualización se utilizó luz UV a una longitud de onda de 254 y 365nm. Las placas fueron reveladas con una solución de ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Posteriormente se unieron las fracciones de acuerdo a su Rf y color de las manchas.

Del fraccionamiento del extracto de AcOEt se obtuvieron 164 fracciones y de acuerdo a las características presentadas mediante cromatografía de capa fina y Rf se unieron, obteniendo como resultado 9 fracciones (FG1-FG9) (Figura. 6) (Tabla 2).

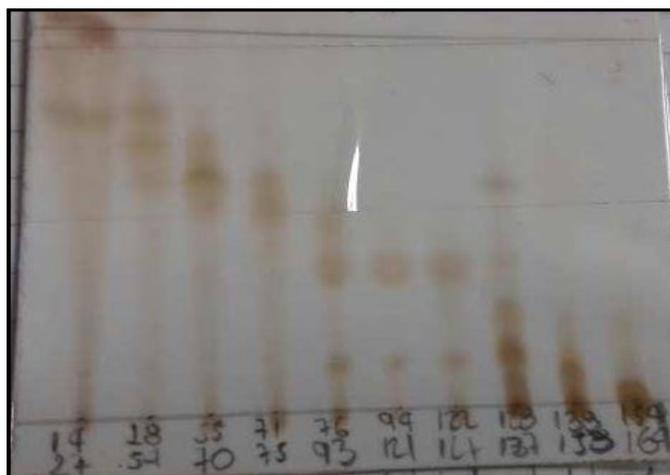


Figura 6. CCF de las fracciones FG1-FG9 (8:2 Hex/AcOEt)

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

Tabla 2. Fracciones obtenidas del extracto total de Acetato de Etilo

Fracción	Muestra	Peso (mg)
FG1	14-27	42.7
FG2	28-54	10
FG3	55-70	6.3
FG4	71-75	2.3
FG5	76-93	6.2
FG6	94-127	63.7
FG7	128-137	25.9
FG8	138-153	139.7
FG9	154-164	85.9

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

2.5.1 Purificación de la fracción FG6.

Para la purificación de la fracción FG6: 94-127, realizamos una columna cromatográfica con 63.7 mg de muestra en 20g de Sílica gel (Merck 0.0015-00) fase directa., utilizando como eluyente Hex-AcOEt (8:2), la misma que fue eluída de manera isocrática. Se obtuvieron 7 fracciones, que fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF). La fracción FG3: 47-61 de acuerdo a la CCF presentó una sola mancha dando lugar al compuesto 1 (Figura. 7) (Tabla 3).



Figura 7. CCF de la fracción FG3: 47-61 (6:4 Hex/AcOEt)

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

Tabla 3. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción FG6

Fracción	Muestra	Peso (mg)
FG1	1-35	9.6
FG2	36-46	6.2
FG3	47-61	5.6
FG4	62-69	5
FG5	70-80	20
FG6	81-103	7.3
FG7	104-115	6

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

2.5.2 Purificación de la fracción FG5.

Para la purificación de la fracción FG5, realizamos una columna cromatográfica con 20 mg de muestra en 10g de Sílica gel (Merck 0.0015-00) fase directa, utilizando como eluyente Hex-AcOEt (8:2), la misma que fue eluída de manera isocrática. Se obtuvieron 11 fracciones, las mismas que fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF). La fracción FG5: 33-36 de acuerdo a la CCF presentó una sola mancha dando lugar al compuesto 2 (Figura. 8).



Figura 8. CCF de la fracción FG5: 33-36 (8:2 Hex/AcOEt)

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

2.6 Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Metanol

El fraccionamiento del extracto total de Metanol se lo realizó en una relación 1:50 extracto: Sílica, para lo cual se pesó 2 g de extracto en 100 g de Sílica gel (Merck 0.0015-00) fase directa. Se eluyó con polaridad creciente iniciando con Hexano y AcOEt en relación 95:5, hasta AcOEt:MeOH (90:10) (Figura. 9). Luego de haber culminado todo el proceso del fraccionamiento del extracto total del Metanol se realizó CCF con todas las fracciones obtenidas utilizando una mezcla de Hex:AcOEt en relación 8:2 (v/v). Para la visualización se utilizó luz UV a una longitud de onda de 254 y 365nm. Las placas fueron reveladas con una solución de ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Posteriormente se unieron las fracciones de acuerdo a su R_f y color de las manchas.



Figura 9. Columna cromatográfica del extracto de Metanol

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

Del fraccionamiento del extracto de Metanol se obtuvieron 345 muestras y de acuerdo a las características presentadas mediante cromatografía de capa fina y Rf se unieron, obteniendo como resultado 9 fracciones (FGM1-FGM9) (Figura. 10) (Tabla 4).

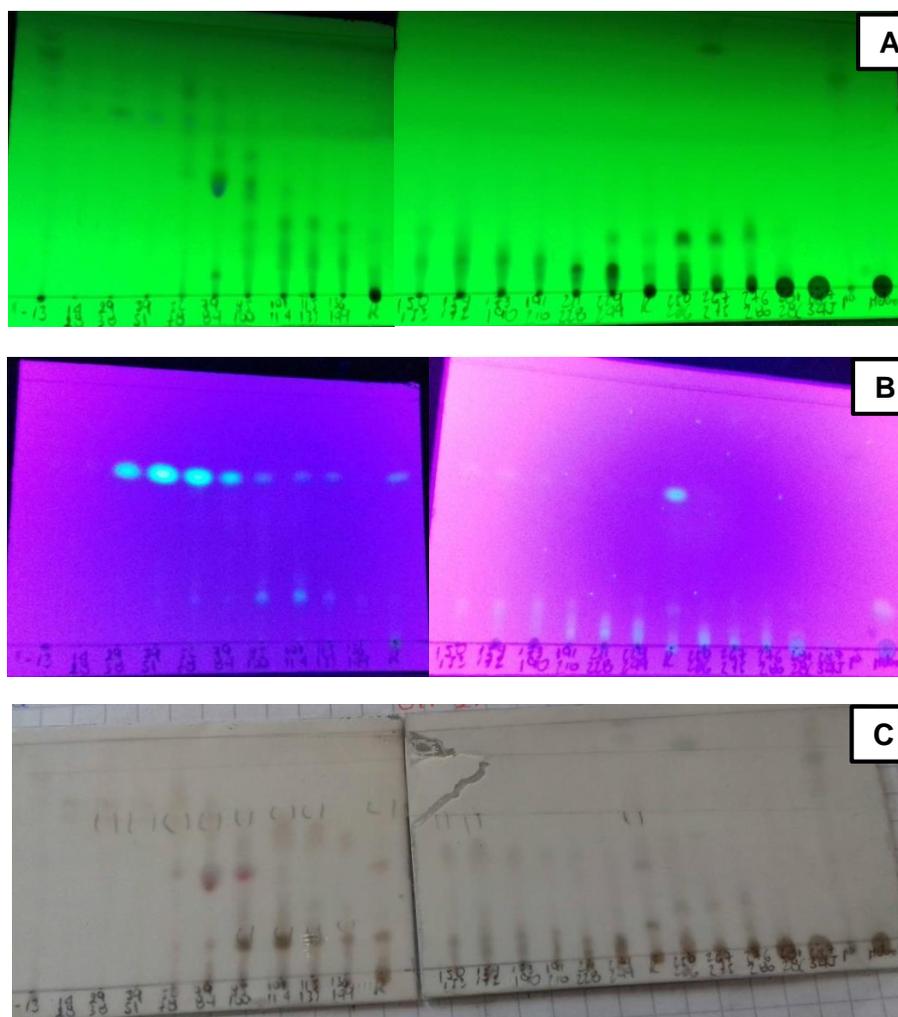


Figura 10. CCF de las fracciones (FGM1-FGM9): a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm, c) Placa revelada

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto total de Metanol

Fracción	Muestra	Peso (mg)
FGM1	1-13	8.3
FGM2	14-51	26
FGM3	52-78	15.5
FGM4	79-84	25
FGM5	85-100	48.9
FGM6	101-149	30
FGM7	150-249	59
FGM8	250-280	73
FGM9	281-345	631.9

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

2.6.1 Purificación de la fracción FGM6.

Para la purificación de la fracción FGM6, realizamos una columna cromatográfica con 30 mg de muestra y 15g de Sílica gel 60 F254 (fase directa), utilizando como eluyente Hex-AcOEt en proporción 8:2, la misma que fue eluída de manera isocrática. Se obtuvieron 7 fracciones, las mismas que fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF). La fracción FGM 5: 37-55 de acuerdo a la CCF presentó una sola mancha dando lugar al compuesto 3 (Figura. 11).



Figura 11. CCF de la fracción FGM5: 37-55 (5:5 Hex/AcOEt)

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

2.7 Identificación de compuestos

2.7.1 Resonancia Magnética Nuclear.

Los compuestos obtenidos se identificaron mediante el análisis de espectros de RMN, en un equipo Varian N° de serie 21953, el cual está operando a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN usando como disolvente CDCl₃ deuterado.

Los desplazamientos químicos (δ) de los espectros están expresados en partes por millón (ppm), y los valores de las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

2.7.2 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.

Para la determinación del peso molecular de los compuestos aislados se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent (modelo 6890N), acoplado a un espectrómetro-detector de masas (modelo Agilent serie 5973 inerte). El espectrómetro dispone de una base de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el mismo que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683.

Se utilizó una columna capilar no polar, DB-5ms-fenil-metilpolisiloxano al 5%, 30 m x 0,25 mm, espesor 0,25 μ m de película, a una temperatura de 350 °C con flujo constante y flujo inicial de 1mL/min a una velocidad promedio de 36cm/seg. Las muestras se disolvieron en diclorometano. Como fase móvil se utilizó helio como gas portador con un ratio de partición 1:1 a una temperatura de 250 °C. El detector presenta 2 temperaturas una de cuadrupolo a 200 °C y una de fuente a 280 °C. La temperatura inicial del horno se ajustó a 50 °C durante un tiempo de 3 min, posteriormente la temperatura fue aumentando a razón de 10°C/min hasta llegar a una temperatura de 270 °C.

2.8 Determinación de la actividad biológica de los extractos

2.8.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante la técnica de Microdilución en caldo, utilizando placas de 96 pocillos.

2.8.2 Microorganismos de prueba.

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

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

2.8.3 Preparación de la muestra.

Para la dilución se usó 100mg de los extractos de Acetato de etilo y Metanol en 1000µl de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se realizó tanto para la determinación de la CMI frente a bacterias y hongos.

2.8.4 Preparación del cultivo overnight.

Para la preparación del cultivo overnight se utilizaron las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en medio de cultivo tripticasa soya y para *Enterococcus faecalis* infusión cerebro corazón, ambos a una temperatura de 37 °C. Por otro lado para *Micrococcus luteus* se utilizó el caldo nutritivo y para la levadura *Candida albicans* caldo Sabouraud, incubados a una temperatura de 35°C. Finalmente todos los microorganismos fueron incubados de 14 a 16 horas y se encuentran en reserva criogénica a -80°C.

2.8.5 Preparación de la suspensión del inóculo para microorganismos.

2.8.5.1 Inóculo para bacterias

Se toman 10 µL del cultivo overnight con la bacteria a utilizar y se colocan en 10mL del caldo Muller Hinton, de esta dilución se toman 100µl para completar el volumen final 200µl de la placa de cultivo.

2.8.5.2 Inóculo para levaduras.

Se toman 10 µL del cultivo overnight con la bacteria a utilizar y se colocan en 10mL del caldo Sabouraud, de esta dilución se toman 100µl para completar el volumen final 200 µL de la placa de cultivo.

2.9 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

2.9.1 Concentración mínima inhibitoria antimicrobiana.

Para determinar la CMI se realizó en placas estériles de 96 pocillos: Primero, se colocó 180µl de caldo Muller Hinton (o Sabouraud) en la primera fila y 100µl en los pocillos restantes. Posteriormente, se adiciona 20µl del extracto diluido, en los pocillos de la fila A. 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 desechemos los 100 µL sobrante, con lo que aseguramos diluciones desde 5000 hasta 39,06 µg/mL.

Para el control de esterilidad se usó la columna A10 – H10, colocando 200µl del caldo Muller Hinton (o Sabouraud). Para el control negativo en la columna A11 se coloca 180µl de caldo + 20µl de DMSO y para el control positivo en la columna A12 se coloca: 180µl de caldo + 20µl de una solución de gentamicina de 1mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*, tetraciclina de 5mg/m para *Enterococcus faecalis* e Itraconazol de 1mg/mL para *Candida albicans*. Preparadas las placas se inoculan con 100µl de la suspensión del inóculo completando el volumen final, ajustando así la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL para bacterias y 5×10^4 UFC/mL para levaduras. Finalmente se sellan las placas, incubándose a 35°C durante 24 horas.

2.10 Actividad enzimática

2.10.1 Ensayo de α-glucosidasa.

Se determinó la actividad inhibidora de α glucosidasa usando una placa de microtitulación de 96 pocillos con p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (PNPG, SIGMA N1377) como sustrato, basados en el método descrito por Tao, Zhang, Cheng, & Wang, 2013, con ligeras modificaciones, utilizando acarbosa como control positivo. Las soluciones de muestra se prepararon usando 10mg de extracto en 210 µl 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 µl de PBS (SIGMA-P4417), se mezcló con 5µl de la muestra y 20µl 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 20µl 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.

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

Siendo:

A_o: Absorbancia registrado para la actividad enzimática sin inhibidor (control).

A_s: Absorbancia registrada para la actividad enzimática en presencia del inhibidor (muestra).

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Extractos obtenidos de *Ganoderma applanatum*

En la tabla 5 se detalla el peso y rendimiento de los extractos totales de Acetato de etilo y Metanol obtenidos a partir de 410g de muestra.

Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos de AcOEt y MeOH

Extracto	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Acetato de Etilo	410 g	4.4296	1.08
Metanol		6.3039	1.54

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

3.2 Compuestos aislados de *Ganoderma applanatum*

En la tabla 6 se indica los compuestos que fueron aislados e identificados del extracto de acetato de etilo y metanol respectivamente.

Tabla 6. Compuestos aislados de *Ganoderma applanatum*

Extractos	Fracción	Compuestos	Polaridad	Peso (mg)
Acetato de etilo	Compuesto 1	Ácido mirístico	6:4 Hex/AcOEt	2.5
	Compuesto 2	Ergosterol	8:2 Hex/AcOEt	17.6
Metanol	Compuesto 3	Peróxido de ergosterol	5:5 Hex/AcOEt	4.8

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

3.3 Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo

3.3.1 Compuesto 1.

El compuesto aislado fue obtenido como líquido incoloro con un peso molecular de 228 g/mol, cuya fórmula química es $C_{14}H_{28}O_2$. Mediante análisis de CG-EM comparado con literatura se identificó como ácido mirístico (Narasimhan, Mourya, & Dhake, 2006) (Figura. 12).

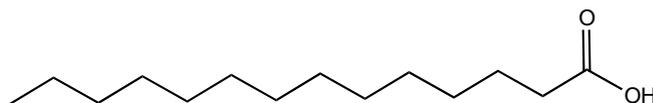


Figura 12. Estructura química del Ácido Mirístico

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

Según el espectro de masas el compuesto 1 comparado con el espectro de la base de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, se identificó como ácido mirístico. Presentando un ion molecular de 228 m/z, en un tiempo de retención de 15.96 minutos (Anexo 1).

El ácido mirístico es un ácido graso saturado que está compuesto por una cadena de 14 carbonos y un grupo carboxílico terminal. Tiene enlaces sencillos entre sus átomos de carbono lo que les confiere una gran estabilidad (Inoue, Hisatsugu, Ishikawa, & Suzuki, 2004). Se encuentra en la mayoría de las grasas animales y vegetales, especialmente en la grasa de mantequilla y los aceites de coco, palma y nuez moscada (Torrejón & Uauy, 2011). Es utilizado como producto intermedio en la fabricación de emulsiones, emolientes, cremas, jabones y pastas (Rustan & Drevon, 2005).

El ácido mirístico tiene usos farmacéuticos como lubricante en formulación de comprimidos, revestimiento farmacéutico de píldoras, remedios amargos y preparación de supositorios y ungüentos (Liebert, 2002).

Estudios previos demostraron que este compuesto combinado con el ácido oleico, palmítico y laúrico previenen la hiperplasia prostática, además de tener efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Ravelo *et al.*, 2011).

3.3.2 Compuesto 2.

El compuesto aislado fue obtenido en forma de cristales blancos con un peso molecular de 396 g/mol, cuya fórmula química es $C_{28}H_{44}O$. Mediante análisis de RMN y comparado con literatura se identificó como Ergosterol (Benavides, 2004) (Figura. 13).

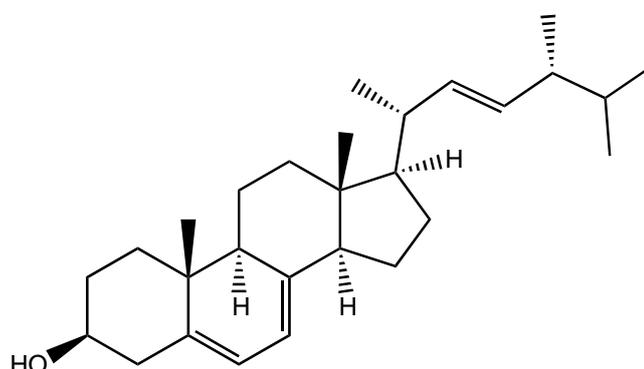


Figura 13. Estructura química del Ergosterol

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

En la tabla 7 se indican los datos de 1H RMN experimentales de la molécula identificada.

Tabla 7. Datos espectroscópicos de ^1H RMN del Ergosterol en CDCl_3 .

Datos Experimentales ^1H RMN (400 MHz) (δ)	(Márquez <i>et al.</i> , 2014) ^1H RMN
5.57 (1H, dd, J= 2.4 Hz, H-6)	5.57 (1H, dd, J= 2.3 Hz, H-6)
5.38 (1H, dd, J= 2.8 Hz, H-7)	5.38 (1H, dd, J= 2.2 Hz, H-7)
5.18 (2H, m, H-22 y H-23)	5.19 (2H, m, H-22 y H-23)
3.62 (1H, m, H-3)	3.63 (1H, m, H-3)
0.63 (3H, s, Me-18)	0.63 (3H, s, Me-18)
0.95 (3H, s, Me-19)	0.94 (3H, s, Me-19)
0.81 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-26)	0.83 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me-26)
0.84 (3H, d, J= 6.4 Hz, Me-27)	0.85 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me-27)
0.92 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-28)	0.92 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-28)
1.02 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me-21)	1.03 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-21)

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

En el espectro de ^1H RMN se observan tres señales a campo bajo δ 5.57 ppm, 5.38 y 5.18, correspondientes a los protones vinílicos H-6, H-7, H-22 y H-23 respectivamente. Mientras que a 3.62 ppm se observa un multiplete típico de un hidrógeno germinal a un grupo hidroxilo, correspondiente al protón H-3. Finalmente a campo alto se observan las señales de los metilos 18, 19, 21, 26, 27, y 28 con desplazamientos de δ 0.63, 0.95, 1.02, 0.81, 0.84, 0.92 ppm respectivamente (Anexo 2).

El ergosterol pertenece a los esteroides que son los más abundantes en el reino fungi (Sánchez, 2010). Está presente en los hongos como constituyente de sus membranas, el cual es necesario para su crecimiento, además sirve como un bioregulador de fluidez e integridad de la membrana (Ahmad, Khan, Manzoor, & Khan, 2010).

Es un triterpeno que se encuentra reportado como precursor de la vitamina D, la cual ayuda al metabolismo óseo, desarrollo neurológico, sistema cardiovascular y regulación del crecimiento celular (Sánchez, 2010).

Presenta importantes actividades antitumorales, antioxidantes y anticoagulantes (Martínez *et al.*, 2016), además reduce el colesterol en la sangre y el riesgo de adquirir enfermedades cardiovasculares (Zhang *et al.*, 2016). También se ha reportado como un compuesto que tiene una ligera actividad citotóxica en contra de líneas celulares cancerígenas (Couttolenc, 2015).

El ergosterol actualmente es considerado como un candidato farmacológico fuerte sin efectos secundarios, sobre todo por el potencial de inducir la muerte de las células cancerosas (Zhang *et al.*, 2016).

3.4 Fraccionamiento del extracto de Metanol

3.4.1 Compuesto 3.

El compuesto aislado fue obtenido en forma de cristales blancos con un peso molecular de 428 g/mol, cuya fórmula química es $C_{28}H_{44}O_3$, Mediante análisis de RMN comparado con literatura se identificó como Peróxido de ergosterol (Correa *et al.*, 2005) (Figura. 14).

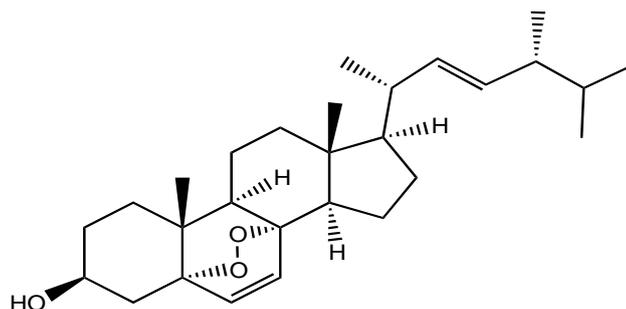


Figura 14. Estructura química del Peróxido de Ergosterol
Fuente: Autora, 2017
Elaboración: Autora, 2017

En la tabla 8 se indican los datos de 1H RMN experimentales de la molécula identificada.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de 1H RMN del Peróxido de Ergosterol en $CDCl_3$

Datos Experimentales 1H RMN (400 MHz) (δ)	(Lee, Shim, Kim, & Kang, 2006) 1H RMN
6.24 (1H, d, J= 8.4 Hz, H-6)	6.24 (1H, d, J= 8.6 Hz, H-6)
6.50 (1H, d, J= 8.8 Hz, H-7)	6.50 (1H, d, J= 8.6 Hz, H-7)
5.18 (2H, m, H-22 y H-23)	5.18 (2H, m, H-22 y H-23)
3.97 (1H, m, H-3)	3.97 (1H, m, H-3)
0.81 (3H, s, Me-18)	0.81 (3H, s, Me-18)
0.88 (3H, s, Me-19)	0.88 (3H, s, Me-19)
0.82 (3H, d, J= 7.2 Hz, Me-26)	0.83 (3H, d, J= 6.9 Hz, Me-26)
0.83 (3H, d, J= 6.4 Hz, Me-27)	0.81 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me-27)
0.91 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-28)	0.91 (3H, d, J= 6.9 Hz, Me-28)
1.00 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me-21)	1.00 (3H, d, J= 6.9 Hz, Me-21)

Fuente: Autora, 2017
Elaboración: Autora, 2017

En el espectro de 1H RMN se observan tres señales a campo bajo δ 6.24 ppm y 6.50 correspondientes al grupo peróxido y otra en 5.18, correspondiente a los protones vinílicos H-22 y H-23. Mientras que a 3.97 ppm se observa un multiplete típico de un hidrógeno germinal a un grupo hidroxilo, correspondiente al protón H-3. Finalmente a campo alto se

observan las señales de los metilos 18, 19, 21, 26, 27, y 28 con desplazamientos de δ 0.81, 0.88, 1.00, 0.82, 0.83, 0.91 ppm respectivamente (Anexo 3).

El peróxido de ergosterol es considerado como un estero natural que se encuentra presente en hongos, levaduras, líquenes y esponjas. Es un terpeno que esta sintetizado por la conversión del ergosterol a través de una corriente lenta de oxígeno y en presencia de un agente fotosensibilizante, originando una oxidación enzimática del ergosterol (Lee *et al.*, 2008).

Presenta importantes actividades antitumorales, antivirales y antiinflamatorias. Por lo tanto este compuesto es muy útil en las áreas de inmunosupresión y terapia del cáncer. (Suk, Su, & Ho, 2001). También se ha reportado que el peróxido de ergosterol actúa como antimicobacteriano, antibacteriano y citotóxico (Lee *et al.*, 2008).

El peróxido de ergosterol es capaz de inhibir el crecimiento del protozooario *Trypanosoma cruzi* debido a la formación inducida de radicales libres en la membrana del parásito, produciendo su disrupción y de esta manera disminuir el número de parásitos en cultivos in vitro. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar este compuesto surge como una nueva alternativa para combatir este protozooario flagelado causante del mal de Chagas, ya que inhibe el crecimiento y la replicación intracelular para *T. cruzi* (Lobato, 2013).

3.5 Determinación de la actividad biológica de los extractos

3.5.1 Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos AcOEt y MeOH del hongo *G. applanatum*, no presentaron actividad para ninguno de los microorganismos empleados en el ensayo como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. CMI antimicrobiana de los extractos totales de *G. applanatum*

Microorganismos	AcOET (µg/mL)	MeOH (µg/mL)	Antibiótico (µg/mL)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA	Gentamicina	0,39
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA		1,56
<i>Micrococcus luteus</i>	NA	NA		< 0,39
<i>Enterococcus faecalis</i>	NA	NA	Tetraciclina	1,9
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	Itraconazol	25

Referencia: NA (No Activo)

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

En la actualidad no se han reportado otros estudios sobre la actividad antimicrobiana de la especie *Ganoderma applanatum*. Sin embargo estudios han revelado que los extractos de *G. applanatum* producen compuestos esteroides que son activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Muhsin, Hafiz, & Khalaf, 2011). Además de poseer actividad antifúngica contra *Candida albicans* (Díaz, 2014).

Esta especie en otro estudio presentó una inhibición en el crecimiento de la cepa de *S. aureus* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 31,25 mg/mL, lo cual indicaría que esta especie de *Ganoderma* podría ser utilizada para combatir infecciones estafilocócicas. Cabe mencionar que no se observó ningún efecto inhibitorio contra los otros microorganismos estudiados (Guzmán & Morales, 2016).

Otras investigaciones reportan que *G. lucidum* perteneciente al mismo género revelo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.75 mg/mL provocando una inhibición en el crecimiento de la bacteria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (Gao et al., 2005).

Los hongos del género *Ganoderma* han sido empleados como una fuente de medicina natural, debido a las diversas actividades biológicas que tienen sus metabolitos secundarios. Sin embargo muy pocas investigaciones han sido llevadas a cabo para determinar su potencialidad contra bacterias y hongos patógenos (Muhsin et al., 2011).

3.6 Actividad enzimática de extractos totales

En la tabla 10 se indica la actividad inhibitoria en α -glucosidasa in vitro de los extractos de Acetato de etilo y Metanol de *Ganoderma applanatum*.

Tabla 10. Efecto inhibitorio de α -glucosidasa en extractos totales de *G. applanatum*

Extractos Totales	IC ₅₀ μ g/mL
AcOEt	27,81
MeOH	215,41

Fuente: Autora, 2017

Elaboración: Autora, 2017

En el ensayo realizado de α -glucosidasa el extracto de Acetato de etilo presenta una actividad inhibitoria relativamente buena con un valor de IC₅₀ de 27,81 μ g/mL, mientras que el extracto de Metanol presenta una actividad inhibitoria baja con un valor de IC₅₀ de 215,41 μ g/mL.

La inhibición enzimática de α -glucosidasa de *G. applanatum* no ha sido reportada hasta el momento. Sin embargo se han realizado estudios en otras especies de *Ganoderma* como *G. lucidum*, el cual tiene una inhibición buena con un IC₅₀ de 15.4 μ g/mL, confirmando tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Fatmawati, Shimizu, & Kondo, 2011). Mientras que en el caso de *G. applanatum* solo el extracto de AcOEt tiene buena actividad inhibitoria con un IC₅₀ de 27,81 μ g/mL.

En conclusión, hemos demostrado que ambos hongos se puede utilizar como terapia para la diabetes mellitus tipo 2, por lo que han sido considerados para el desarrollo de fármacos hipolipidémicos y antidiabéticos (Fatmawati et al., 2011).

Cabe mencionar que valores de IC₅₀ inferiores a 50 μ M tienen una fuerte actividad inhibitoria contra α -glucosidasa, mientras que valores de IC₅₀ superior a 50 μ M presentan una actividad inhibitoria débil (Wang et al., 2015).

CONCLUSIONES

Del extracto total de Acetato de etilo se identificaron 2 compuestos conocidos como ergosterol y ácido mirístico y del extracto de Metanol se identificó un compuesto conocido como peróxido de ergosterol.

Los extractos de acetato de etilo y metanol del hongo *G. applanatum* no presentaron actividad antimicrobiana para ninguna de las cepas empleadas en el ensayo.

En el ensayo realizado de α -glucosidasa el extracto de Acetato de etilo presenta una actividad inhibitoria relativamente buena con un valor de IC_{50} de 27,81 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el extracto de Metanol presenta una actividad inhibitoria baja con un valor de IC_{50} de 215,41 $\mu\text{g/mL}$.

RECOMENDACIONES

Continuar con el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios en diferentes disolventes de la especie *Ganoderma applanatum*, ya que son pocos los estudios realizados en el Ecuador.

Realizar diferentes pruebas biológicas como antitumoral, antioxidante, anticoagulante de los metabolitos secundarios aislados de *Ganoderma applanatum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85 (SUPPL.), 76–81.
- Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., & Khan, L. A. (2010). Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, 48(1), 35–41.
- 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.
- Atencio, L., Rivera, J., Aranaga, V., Navarro, C., & Guiñez, J. (2009). Caracterización de plásmidos y de la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Micrococcus sp.*, (1), 77–95.
- Ávalos, A., & García, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Benavides, O. (2004). Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes*. Universidad Nacional de Colombia.
- Boh, B., Hodžar, D., Dolničar, D., Berovič, M., & Pohleven, F. (2000). Isolation and Quantification of Triterpenoid Acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian Origin. *Food Technology and Biotechnology*, 38(1), 11–18.
- Bustos, J., Hamdan, A., & Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Biomed, Rev*, 17(4), 287–305.
- Chin, J. (2001). Enfermedades transmisibles. *Medwave* (Vol. 1).
- Chong, E., & Herrera, W. (1994). Diabetes mellitus tipo 2: hipoglicemiantes orales, 38–42.
- Correa, E., Quiñones, W., Torres, F., Cardona, D., Franco, A. E., Robledo, S., & Echeverri, F. (2005). Actividad leishmanicida de *Pycnoporus sanguineus*, 27, 39–42.
- Couttolenc, A. (2015). Estudio químico del hongo marino endófito *Curvularia trifolii* nativo del Sistema Arrecifal Veracruzano. Universidad Veracruzana Centro de Investigaciones

Biomédicas.

- De León, I. (2016). Caracterización fisicoquímica 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 Facultad de Ingeniería.
- Díaz, J. (2014). Evaluación del efecto antifúngico de extractos de macromicetos del noreste de México contra aislamientos clínicos de hongos oportunistas. Universidad Autónoma De Nuevo León.
- Díaz, M., Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Fundamental features on the *Enterococcus* genus as a very important pathogen at present time, *48*(2), 147–161.
- Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R., & Santa, S. (2008). Resonancia Magnética Nuclear De Protón. Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, (Madrid, España), 1–47.
- Escorcía, S. (2009). Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos, *17*(3), 120–128.
- Espina, M., Guillen, G., Calvo, B., & Meza, L. (2005). Caracterización morfológica y fisiológica de las especies *Candida* aisladas de la cavidad bucal de pacientes geriátricos. *Ciencia Odontológica*, *2*, 110–119.
- Fatmawati, S., Shimizu, K., & Kondo, R. (2011). Phytomedicine Ganoderol B: A potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *European Journal of Integrative Medicine*, *18*(12), 1053–1055.
- Gao, Y., Tang, W., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Li, X., & Zhou, S. (2005). Antimicrobial Activity of the Medicinal Mushroom *Ganoderma*, 37–41.
- Garrido, L. (2014). Inhibidores de glucosidasas en alimentos. Universidad de Valladolid.
- Garrido, R., Vélez, H., & Vérez, V. (2013). Resonancia magnética nuclear: Nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. *VacciMonitor*, *22*(1), 35–42.
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos, *30*, 33–39.

- Gutiérrez, S., Casqueiro, J., & Martín, F. (2000). Los hongos como factorías celulares : biodiversidad de metabolitos secundarios, 54–60.
- Gutiérrez, M. C., Droguet, M., & Odeur, U. N. E. M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Résumé :, 35–41.
- Guzmán, B., & Morales, E. (2016). “Actividad antibacteriana de extractos fúngicos de *Ganoderma applanatum* sobre cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas del hardware de computadoras del Hospital Cesar Garayar – Iquitos ” Tesis. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Guzmán, M., Santa Fe, G., Salcedo, M., Angulo, A., & Torres, O. (2013). Chemical study and antioxidant and bactericide activitie from *Ganoderma applanatum*, 11(1), 88–93.
- Hadacek, F. (2002). Secondary Metabolites as Plant Traits : Current Assessment and Future Perspectives. *Methods*, 21(4), 273–322.
- Hernández, A., Torres, O., Carrasco, B., Nasiff, A., Castelo, L., Pérez, L., & Fernández, F. (2011). Pharmacological treatment of prediabetes, 22(1), 36–45.
- Inoue, T., Hisatsugu, Y., Ishikawa, R., & Suzuki, M. (2004). Solid – liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures. Mixtures of oleic acid with lauric acid, myristic acid, and palmitic acid, 127, 161–173.
- Khaled, H., Shtaywy, S., Sami, K., Hakam, F., Nabil, a, Sawsan, a, Editor, L. (1995). J ordan J ournal of Biological S ciences. *Jordan Journal of Biological Sciences*.
- 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
- Kocur, M., Kloos, W. E., & Schleifer, K. (2006). The Genus *Micrococcus*, 961–971.
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013, June). Reino Fungi : morfologías y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica*, 28(January), 11–18.
- Lee, J., Ma, C., Park, D., Yoshimi, Y., Hatanaka, M., & Hattori, M. (2008). Transformation of Ergosterol Peroxide to Cytotoxic Substances by Rat Intestinal Bacteria, 31, 949–954.
- Lee, S. H., Shim, S. H., Kim, J. S., & Kang, S. S. (2006). Constituents from the Fruiting Bodies of *Ganoderma applanatum* and Their Aldose Reductase Inhibitory Activity,

29(6), 479–480.

- Li, L., Li, H., Peng, X., Hou, B., Yu, M., Dong, J., Qiu, M. (2016). (±)-Ganoapplanin, a Pair of Polycyclic Meroterpenoid Enantiomers from *Ganoderma applanatum*, 1.
- Liebert, M. (2002). Final Report on the Safety Assessment of Oleic Acid, Lauric Acid, Palmitic Acid, Myristic Acid, and Stearic Acid, 6.
- Lobato, C. (2013). Evaluación in vitro de la actividad de derivados de ergosterol y colesterol contra *Trypanosoma cruzi*. Universidad Veracruzana Centro de Investigaciones Biomédicas.
- López, M., Méndez, J., Pérez, F., & Torres, M. (2012). Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas, 1–133.
- Márquez, O., Juárez, L., & Trigos, A. (2014). Aislamiento e identificación de esteroides de una cepa comercial de *Pleurotus* sp.
- Martinez, M., Torrez, S., Campi, M. G., Bravo, J. A., & Vila, J. L. (2015). Ergosterol from the mushroom *laetiporus* sp. isolation and structural characterization, 90–94.
- Mata de Henning, M., & Perrone, M. (2001). La prótesis odontológica en la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. Instituto de investigaciones odontológicas, 3.
- Ming, D., Chilton, J., Fogarty, F., & Towers, G. N. (2002). Chemical constituents of *Ganoderma applanatum* of British Columbia forests. *Fitoterapia*, 73(2), 147-152.
- Montes, B., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica*, 23(2), 213–224.
- Muhsin, T., Hafiz, A., & Khalaf, K. (2011). Bioactive Compounds from a Polypore Fungus *Ganoderma applanatum* (Per s. ex Wallr.) Pat., 4, 205–212.
- Naranjo, J. (2014). Caracterización morfológica y molecular del género. Universidad Nacional De Colombia.
- Narasimhan, B., Mourya, V., & Dhake, A. (2006). Design, synthesis, antibacterial, and QSAR studies of myristic acid derivatives, 16, 3023–3029.
- Peñarrieta, M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). Phenolic compounds in

food, 31, 68–81.

Pérez, P. (2015). Hongos de Ecuador. Sociedad Micológica de Madrid.

Pontón, J., Moragues, M., Gene, J., Guarro, J., & Quindos, G. (2002). Hongos y actinomicetos alergénicos (Primera ed). Bilbao, País Vasco, España: Revista Iberoamericana de Micología.

Popoff, O., & Ferraro, L. (2002). Hongos y líquenes del macrosistema Iberá. Revistacyt.Unne.Edu.Ar. Argentina.

Quiriz, F. (2012). Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de dos especies del hongo medicinal *Ganoderma* nativo de México y su contribución al desarrollo regional. Control. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Recuperado de

http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez_Borja_M_DC_Fitosanidad_2010.pdf?sequence=1

Ra, M., Karaman, M., Jak, M., Kebert, M., Novakovi, A., & Popovi, M. (2016). Original article Mineral composition, antioxidant and cytotoxic biopotentials of wild-growing *Ganoderma* species (Serbia): *G. lucidum* (Curtis), 2583–2590.

Ravelo, Y., Molina, V., Jiménez, S., Oyarzábal, A., Pérez, Y., & Mas, R. (2011). Effect of Oral Administration of D-004 , a Lipid Extract from *Roystonea regia* Fruits , on Xylene-Induced Ear Oedema in Mice, 30.

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 postgrados.

Rivero, M., Padola, N., Etcheverría, A., & Parma, A. (2004). *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. Medicina, 64(4), 352–356.

Rocha, L. (2000). Control de calidad de productos fitoterapéuticos. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos., 78, 157.

Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de

Escherichia coli. Salud Pública de México, 44(5), 464–475.

Ruiz, P. O., Rojas, K. C., & Sieverding, E. (2011). La distribución geográfica de los hongos de micorriza arbuscular: una prioridad de investigación en la amazonía peruana. Espacio Y Desarrollo, 23, 47–63.

Rustan, A., & Drevon, C. (2005). Fatty Acids : Structures and Properties, 1–7.

Salazar, W. (2014). Diversidad de los generos *Ganoderma* y *Amauroderma* en el Ecuador. Universidad Católica del Ecuador.

Sánchez A. (2010). Vitamina D: Actualización. Rev. Méd. Rosario. 70-87.

Sharapin, N. (2000). Extracción de Materias Primas. In Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos (pp. 40–54).

Sobrado, S., Cabral, E., Romero, F. (2013). Hongos: Diversidad Vegetal. Universidad Nacional de Nordeste.

Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment, 32(2), 93–98.

Suk, K., Su, Y., & Ho, Y. (2001). Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*, 69, 229–237.

Torrejón, C., & Uauy, R. (2011). Quality of fat intake, atherosclerosis and coronary disease: effects of saturated and trans fatty acids, 924–931.

Torrenegra, R., & Baquero, J. (1999). Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium spg 28*. Aislada del páramo de guasca, departamento de cundinamarca.

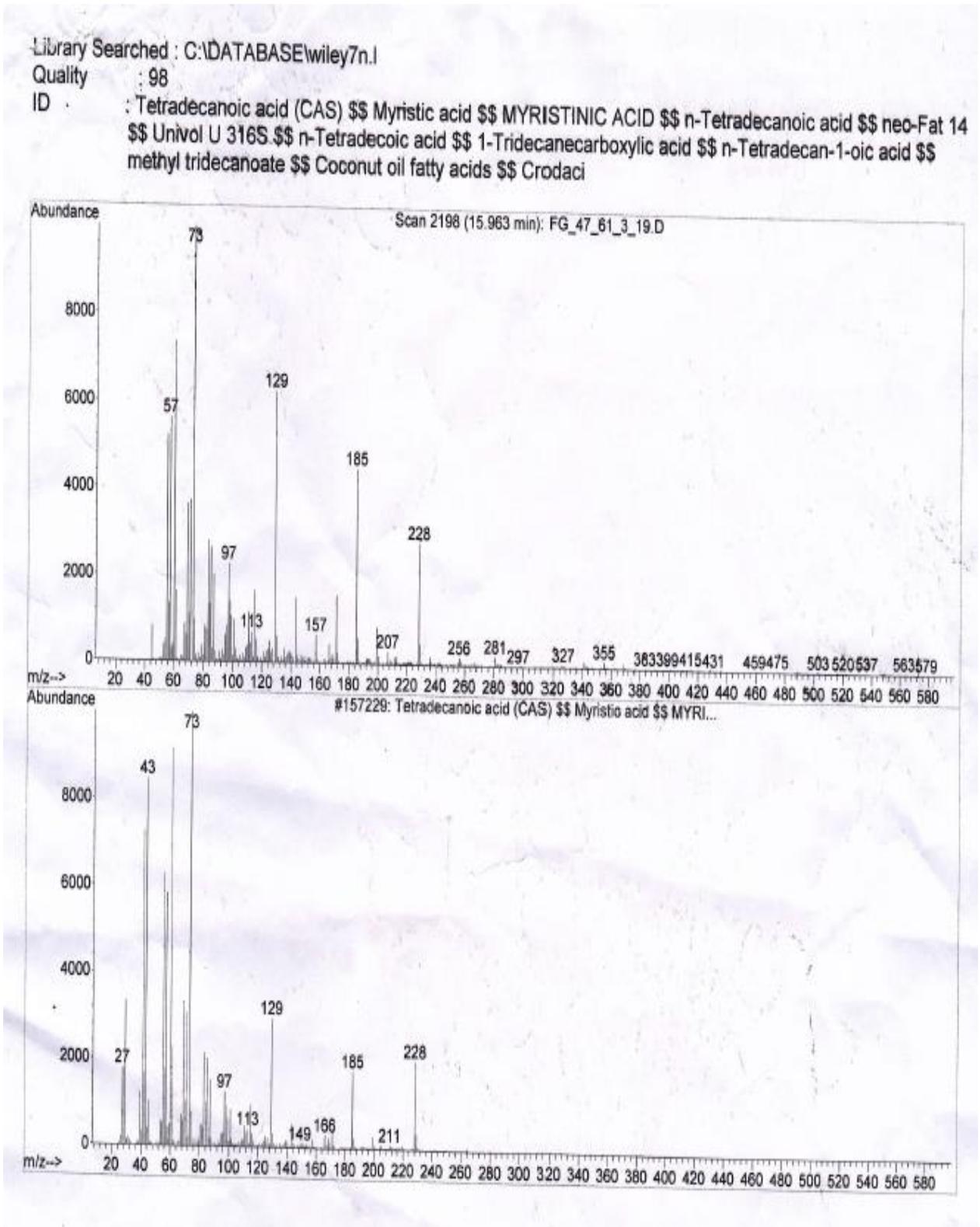
Trutmann, P., & Luque, A. (2012). *Los Hongos Olvidados del Perú*. Congreso Nacional de investigaciones en antropología Perú.

Wang, K., Bao, L., Xiong, W., Han, J., Wang, W., Yin, W., & Liu, H. (2015). Lanostane Triterpenes from the Tibetan Medicinal Mushroom *Ganoderma leucocontextum* and their Inhibitory effects on HMG-CoA Reductase and α - Glucosidase.

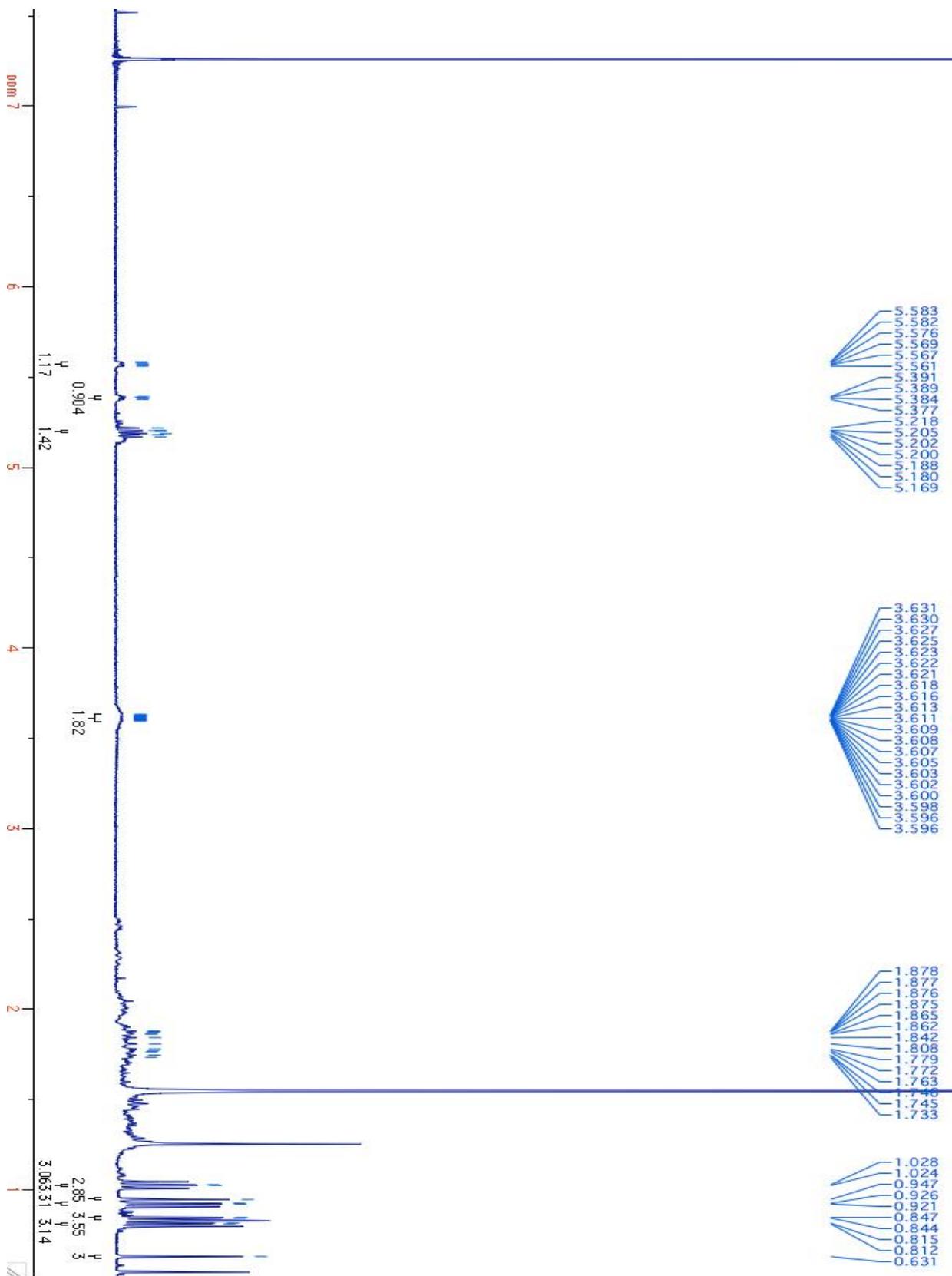
Zhang, H., Firempong, C. K., Wang, Y., Xu, W., Wang, M., Cao, X., Xu, X. (2016). nanoparticles with enhanced in vitro antitumor activity and oral bioavailability. Nature Publishing Group, 1–11.

ANEXOS

Anexo 1. Espectro CG-EM del ácido mirístico



Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Ergosterol (^1H , 400MHz, CDCl_3)



Anexo 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Peróxido de Ergosterol (^1H , 400MHz, CDCl_3)

