



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ARÉA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Actividad anticolinesterásica e hipoglucemiante de extractos obtenidos de hongos basidiomicetos del cantón Loja y Saraguro

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Armijos Celi, Karla Fernanda

DIRECTOR: Cartuche Flores, Luis Emilio, M. Sc.

LOJA – ECUADOR

2018



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>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Luis Emilio Cartuche Flores

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “Actividad anticolinesterásica e hipoglucemiante de extractos obtenidos de hongos Basidiomicetos del cantón Loja y Saraguro” realizado por Armijos Celi Karla Fernanda, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2018

F) _____

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Armijos Celi Fernanda declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Actividad anticolinesterásica e hipoglucemiante de extractos obtenidos de hongos Basidiomicetos del cantón Loja y Saraguro, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo el Mgtr. Luis Emilio Cartuche Flores 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: Armijos Celi Fernanda

Cédula: 1105590655

DEDICATORIA

“Ustedes no son de ningún modo parecidas a mi rosa, ustedes no son nada aún – les dijo. – Nadie las ha domesticado y ustedes no han domesticado a nadie. Ustedes son como era mi zorro. No era más que un zorro parecido a cien mil otros. Pero me hice amigo de él, y ahora es único en el mundo. Ustedes son bellas, pero están vacías – agregó. – No se puede morir por ustedes.

Seguramente, cualquiera que pase creería que mi rosa se les parece.

Pero ella sola es más importante que todas ustedes, puesto que es ella a quien he regado. Puesto que es ella a quien abrigué bajo el globo. Puesto que es ella a quien protegí con la pantalla.

Puesto que es ella la rosa cuyas orugas maté (salvo las dos o tres para las mariposas).

Puesto que es ella a quien escuché quejarse, o alabarse, o incluso a veces callarse.

Puesto que es mi rosa. Es el tiempo que has perdido en tu rosa lo que hace a tu rosa tan importante... Sólo se ve bien con el corazón. Lo esencial es invisible a los ojos.” -El Principito

Es el tiempo que llevamos juntos lo que hace a estas personas inigualables, el trabajo y esfuerzo que emplearon en mí, hoy se los dedico así: a mi Madre Naditha, por darme la vida y a mi Galito, Padre querido, por enseñarme a vivirla. A mis hermanos Daniel, Jonathan y Emilia por ser mis cómplices y compañeros de aventuras.

A mis tías Nachita y Mercy que con su apoyo y cariño me han incentivado a culminar mi carrera, y a Josito por ayudarme a conseguirlo y ser como un hermano para mí.

A Víctor Emilio y Elsie María, que forjaron mi carácter fuerte y me heredaron sus enseñanzas (el mal genio), su amor incondicional y el valor para enfrentar la vida.

Con cariño

Nanda

AGRADECIMIENTO

Agradezco de manera especial a toda mi familia, los Runchitos que son el pilar fundamental de mi vida, a cada uno los quiero y los recuerdo en cada momento.

A todos los que caminaron junto a mí y me enseñaron que los valores no son más que palabras bonitas y sin sentido ni aplicación en la vida.

A Doña Lu, por que el personal de limpieza es el más humilde y un gran apoyo para todos los que sabemos apreciar su trabajo.

A Sandrita, la secretaria de la titulación, que por su labor hace que nuestro paso por la universidad sea más sencillo y llevadero.

A todos los técnicos y personal del departamento de química que con sus enseñanzas me supieron guiar durante transcurso de mi trabajo.

A el Mgtr. José Miguel Andrade y PhD. Darío Cruz, por su paciencia y dedicación, ¡gracias profes!

De manera especial al Mgtr. Luis Cartuche, por ser un gran tutor, un amigo y compañero de trabajo, siendo su conocimiento, apoyo y su ayuda crucial para lograr esta meta.

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto
Me dio el corazón, que agita su marco
Cuando miro el fruto, del cerebro humano
Cuando miro el bueno tan lejos del malo
Cuando miro el fondo de tus ojos claros” Mercedes Sosa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1. Basidiomicetos	6
1.1. Clasificación taxonómica.....	6
1.1.1. Características.....	6
1.1.2. Usos medicinales	7
1.2. Diabetes.....	9
1.2.1. Diabetes Mellitus, no insulina dependiente. Tipo II.	11
1.3. Enfermedades Neurodegenerativas	12
1.3.1. Enfermedad de Alzheimer	12
1.4. Mecanismos de Inhibición Enzimática.....	14
1.4.1. Tipos de inhibición enzimática reversible	14
1.4.1. Inhibición enzimática de alfa – amilasa y alfa – glucosidasa.....	17
1.4.2. Inhibición enzimática de Acetilcolinesterasa	19
CAPÍTULO II.....	21
DISEÑO METODOLÓGICO.....	21

2. Metodología	22
2.1. Recolección de la materia fúngica.....	22
2.2. Obtención de extractos	23
2.3. Ensayos de Actividad Enzimática.....	24
CAPÍTULO III.....	27
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3. Hongos encontrados	28
3.1. Extractos obtenidos de la materia fúngica.....	31
3.2. Actividad enzimática de los extractos.....	34
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	49
ANEXO 1. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA ALFA – GLUCOSIDASA.....	50
ANEXO 2. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA ALFA -AMILASA.....	51
ANEXO 3. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA ACETILCOLINESTERASA.....	52
ANEXO 4. HONGOS RECOLECTADOS EN CERRO ACACANA, PARROQUIA SAN LUCAS Y EN INKAPIRCA, CANTÓN SARAGURO.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especímenes recolectados en el cerro Acacana, parroquia San Lucas del cantón Loja.....	28
Tabla 2. Especímenes recolectados en Mollón, parroquia San Lucas en el cantón Loja.	28
Tabla 3. Especímenes recolectados en Loma de Torre, sector Inkapirca del cantón Saraguro.....	29
Tabla 4. Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos en relación al peso seco de cada muestra y el extracto obtenido.	33
Tabla 5. Porcentaje de Inhibición y CI 50 de los extractos probados frente al sistema α -glucosidasa.....	35
Tabla 6. Porcentaje de inhibición e CI ₅₀ de los extractos frente al sistema de Alfa – amilasa.	37
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de los extractos frente al sistema acetilcolinesterasa. .	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) Los inhibidores competitivos interfieren directamente con el sitio de unión de una enzima para garantizar que el sustrato no se ajuste. (B) Los inhibidores no competitivos se unen a un sitio alostérico de una enzima, cambiando su forma.....	15
Figura 2. Los inhibidores alostéricos modifican el sitio activo de la enzima de modo que se reduce o previene la unión del sustrato. Por el contrario, los activadores alostéricos modifican el sitio activo de la enzima de modo que aumenta la afinidad por el sustrato. .	16
Figura 3. Ubicación de los lugares de recolección.	22
Figura 4. Espécimen basidiomiceto en su ambiente natural perteneciente al género <i>Pholiota</i>	23
Figura 5. Porcentaje de rendimientos de los extractos.	31
Figura 6. <i>Omphalina</i> sp. (EM -779)	53
Figura 7. <i>Macrolepiota procera</i> (EM -781).....	53
Figura 8. <i>Oudemansiella platensis</i> (EM -777).....	53
Figura 9. <i>Stereum</i> sp. (EM -775)	53
Figura 10. <i>Trogia brevipes</i> (EM -797).....	54
Figura 11. <i>Trichamptum</i> sp.(EM -794).....	54
Figura 12. <i>Stereum</i> cf. <i>Hirsutum</i> (EM -802).....	54
Figura 13. <i>Lentinus crenitus</i> (EM -800)	54
Figura 14. <i>Ganoderma amazonense</i> (EM -774)	54
Figura 15. <i>Gerronema</i> sp. (EM -783)	55
Figura 16. <i>Laetiporus</i> sp.(EM -785).....	55
Figura 17. <i>Galerina</i> sp. (EM -782).....	55

RESUMEN

Numerosas especies de hongos silvestres se encuentran distribuidos en ecosistemas del sur del Ecuador. La evaluación de su valor nutricional hasta ahora ha sido limitada, debido a la poca información de sus componentes y los usos que se les puedan atribuir; por lo que, en el presente estudio se planteó la evaluación de 20 especímenes de hongos basidiomicetos en los cantones Loja y Saraguro. De los cuerpos fructíferos se obtuvieron extractos empleando metanol:agua y, se evaluaron frente a los sistemas enzimáticos: α -glucosidasa, α -amilasa y acetilcolinesterasa. Para α -glucosidasa, las muestras *Laetiporus* sp. (EM-562) y *Gerronema* sp. (EM-783) presentaron una alta capacidad inhibitoria con valores de CI_{50} de 47, 55 y 56,42 μ g/ mL respectivamente. En α -amilasa los extractos más representativos fueron: *Laetiporus* cf. *sulphureus*, *Ganoderma* cf. *amazonense*, *Stereum* sp., *Oudemansiella platensis*, *Macrolepiota procera*, *Gerronema* sp, *Laetiporus* sp. (EM-785), *Trametes versicolor*, *Schizophyllum comune*, *Stereum* cf. *Hirsutum* y Cf. *Entoloma*, con valores entre 0,042 y 0,73 μ g/mL. Ninguna de las 20 muestras presentó un porcentaje de inhibición superior al 50% frente a acetilcolinesterasa, a una dosis de 2 mg/mL.

Palabras clave: hongos, fungi, extractos, α -glucosidasa, α -amilasa, acetilcolinesterasa, CI_{50} .

ABSTRACT

A great variety of wild mushrooms are distributed in ecosystems of southern Ecuador and the research of their nutritional value or pharmacological properties has been limited, focusing mainly on ecological factors. For this reason, the aim of the present study was to value the pharmacological potential of 20 specimens of basidiomycete fungi collected in Loja and Saraguro cantons. From the fruiting bodies of each genus, extracts were obtained using methanol and water, which were evaluated against the enzymatic systems: α -glucosidase, α -amylase and acetylcholinesterase. For α -glucosidase, the highest inhibitory capacity was obtained for *Laetiporus* sp. (EM-562) and *Gerronema* sp. (EM-783) with IC_{50} values of 47,55 and 56.42 $\mu\text{g/mL}$ respectively. In α -amylase the most representative extracts were: *Laetiporus* cf. *sulphureus*, *Ganoderma* cf. *amazonense*, *Stereum* sp., *Oudemansiella platensis*, *Macrolepiota procera*, *Gerronema* sp., *Laetiporus* sp. (EM-785), *Trametes versicolor*, *Schizophyllum comune*, *Stereum* cf. *hirsutum* and *Cf. Entoloma*, which reached values between 0.042 and 0.73 $\mu\text{g} / \text{mL}$. None of the 20 samples showed a percentage of inhibition higher than 50% against acetylcholinesterase, at a maximum dose of 2 mg / mL.

Key words: mushrooms, fungi, extracts, α -glucosidase, α -amylase, acetylcholinesterase, IC_{50} .

INTRODUCCIÓN

Los macro-hongos conocidos informalmente como setas, son organismos que poseen órganos productores de esporas generalmente característicos en los basidiomicetos y los ascomicetos. Estos hongos se encuentran distribuidos abundantemente en la naturaleza y pueden vivir en diferentes ecosistemas como, por ejemplo, suelo, aguas dulces o marinas, entre otros. Se estima que en todo el mundo existen entre 1,5 y 2,5 millones de especies de hongos. De esta gran diversidad, muchas especies son comestibles y se destacan constituyendo una alternativa para mejorar la alimentación humana debido a sus propiedades nutritivas, y por poseer componentes bioactivos, proteínas de alta calidad, minerales, vitaminas, carbohidratos, fibra y bajo contenido de grasa, que pueden actuar como antitumorales y moduladores inmunológicos (Ríos, Hoyos, & Mosquera, 2010).

Los basidiomicetos se distinguen de los ascomicetos basándose en caracteres morfológicos como la formación de sus esporas, el color y la forma de las mismas y la apariencia de sus cuerpos. Claramente, los hongos más estudiados pertenecen al grupo de los basidiomicetos, ya que son visibles a simple vista y de interés por sus propiedades gastronómicas y valor económico (Cenci, Cocchi, Petrini, & European Commission. Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability., 2011).

Los hongos se consideran como alimentos funcionales con componentes fisiológicos benéficos; los amplios valores medicinales de los hongos tienen un futuro prometedor como una rama de la medicina alternativa y, por lo tanto, la investigación científica dirigida a la validación de las propiedades medicinales es vital (Abdullah, Ismail, Aminudin, Shuib, & Lau, 2012).

Algunas setas se destacan por poseer metabolitos, incluyendo polisacáridos, proteínas, fibras dietéticas, y muchas otras biomoléculas, que aisladas de hongos y su micelio cultivado, han demostrado tener éxito en el tratamiento de la diabetes como antihiperglicémico (De Silva, Rapior, Hyde, & Bahkali, 2012).

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica como resultado de la deficiencia de la secreción o acción de la insulina. Un enfoque terapéutico para el tratamiento de la diabetes es disminuir la glucemia posprandial por inhibición de las enzimas responsables de la hidrólisis de carbohidratos, tales como α -glucosidasa y α -amilasa (Hanh et al., 2014)

Los Champiñones, conocidos por su potente propiedad antioxidante, han atraído el interés debido a su potencial en neuroprotección, efectos antioxidantes y antiinflamatorios, en una variedad de modelos experimentales (Phan, David, Naidu, Wong, & Sabaratnam, 2015).

En el presente estudio se analizó la naturaleza biológica de los hongos pertenecientes al filo Basidiomycota y sus usos dentro de la medicina, recopilando información actualizada que se encuentra contemplada en el primer capítulo. En el segundo capítulo se expone los métodos utilizados para la selección de especímenes fúngicos, obtención de extractos a partir de ellos y su evaluación frente a los sistemas enzimáticos α -glucosidasa, α -amilasa y acetilcolinesterasa. El capítulo tres abarca los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto, analizando los datos más relevantes del mismo.

El propósito de la presente investigación consistió en revalorizar la diversidad fúngica y su potencial farmacológico a través del estudio de las propiedades hipoglucemiantes y anticolinesterásicas, mediante la recolección, identificación y selección de 20 muestras de hongos para evaluar su capacidad como inhibidores enzimáticos de alfa-amilasa, alfa glucosidasa y acetilcolinesterasa.

Los ensayos de actividad hipoglucemiante que demostraron una capacidad inhibitoria para los dos sistemas enzimáticos fueron los extractos de: *Laetiporus* sp. (EM-562) y *Gerronema* sp. (EM-783), mientras que para el sistema de acetilcolinesterasa ninguno de los hongos evaluados presentó una actividad significativa considerable.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1. Basidiomicetos

Los hongos del filo Basidiomycota (basidiomicetos), constituyen alrededor del 37% de los hongos descritos (Riley et al., 2013), sin embargo, algunas estimaciones de las cifras totales sugieren que pueden existir 1.5 millones de especies que incluyen setas, carboncillos, trufas, colmenillas, mohos y levaduras, así como muchos organismos menos conocidos (Blackwell, Rytas, Timothy Y, & Taylor, 2012)

1.1. Clasificación taxonómica

Los hongos son organismos pertenecientes al dominio Eucaria, y dentro de la clasificación que agrupa a los seres vivos en cinco reinos, los hongos (eumicetos) constituyen el reino Fungi (Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini, 2008).

La clasificación filogenética de los hongos divide el reino Fungi en siete filos, 10 subfilos, 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes (Ahmadjian, Alexopoulos, & Moore, 2018).

Dentro de los siete filos de hongos se encuentran los hongos verdaderos, que se denominan así debido a que su pared celular está compuesta por quitina, y, a diferencia de los falsos hongos o pseudohongos, sus paredes celulares contienen celulosa por lo que recientemente se los incluye en el reino Chromista (Gallejo Arjona, 2016)

Los siete filos comprenden: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (los dos últimos se combinan en el subgrupo Dikarya) (Ahmadjian et al., 2018)

Los «hongos superiores» (Ascomycota y Basidiomycota) constituyen ahora un grupo monofilético con categoría de subreino: Dikarya. Esto hace referencia a que en alguna etapa de su ciclo vital presentan células dicarióticas, con dos núcleos haploides en cada una (Gallejo Arjona, 2016).

1.1.1. Características

Los basidiomicetos constituyen el segundo mayor filo de hongos, que comprende especies divididas en tres grupos principales, el Agaricomycotina (formadores de hongos), Pucciniomycotina (royas y aliados), y Ustilaginomycotina (carboncillos y aliados) (Nagy & Szöllősi, 2017).

Pueden ser unicelulares o multicelulares, con reproducción sexual o asexual, y vivir en ambientes terrestres o acuáticos (Swann & Hibbett, 2007).

Son hongos típicamente filamentosos compuestos de hifas. La mayoría de las especies se reproducen sexualmente con un órgano portador de esporas denominado basidio, (del griego basidium, garrote) que generalmente produce cuatro esporas sexuales (basidiosporas). Los basidios nacen de los cuerpos fructíferos (basidiocarpos), que son grandes y llamativos en todos excepto en las levaduras, las royas y las cenizas (The Editors of Encyclopaedia Britannica., 2017).

Este filo diverso abarca simbioses, patógenos y saprófitos que incluyen hongos que se descomponen en la madera, especies denominadas vulgarmente como: royas, carbones, hongos gelatinosos, hongos de palo, hongos coral y de plataforma, los champiñones, las trufas, los cuernos de aguijón y los nidos de pájaro (Ahmadjian et al., 2018).

Dentro de su composición química, poseen el 50 a 65% de carbohidratos totales, 19 a 35% de proteínas (con diversas actividades biológicas y medicinales, como lectinas) y 2 a 6% de contenido graso de su materia seca. En los hongos, los ácidos grasos insaturados son predominantes sobre los ácidos grasos saturados, especialmente el ácido palmítico, el ácido oleico y el ácido linoleico, mientras que la proporción de ácidos grasos linolénicos es muy limitada. Se cree que las vitaminas ricas en grasas enriquecidas con hongos junto con el contenido de ergosterol son la única fuente vegetariana de vitamina D. Los datos sobre el contenido y composición de la fibra son limitados, pero los polisacáridos como los b-glucanos aumentan el valor nutricional de los hongos. Se ha observado un descubrimiento de que los hongos son una comida maravillosa con sus inmensas propiedades nutraceuticas. Y por esta una de las razones es la presencia de moléculas bioactivas, es decir, b-glucanos, triterpenoides, antioxidantes, etc (Rathore, Prasad, & Sharma, 2017).

1.1.2. Usos medicinales

Aproximadamente 130 propiedades biológicas se atribuyen a los hongos medicinales entre las que destacan: propiedades antitumorales, inmunomoduladores, antioxidantes, anti-hipercolesterolemia, antivirales, antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos, desintoxicantes, hepatoprotectores, antidiabéticos, etc. Se ha demostrado que todos los hongos basidiomicetos contienen compuestos bioactivos en sus cuerpos fructíferos, el micelio cultivado y el caldo de cultivo (Wasser, 2017).

Muchas sustancias farmacéuticas con propiedades potentes y únicas se extrajeron recientemente de las setas y se abrieron paso por todo el mundo (Rai, Tidke, & Wasser, 2004). Esto incluye principalmente moléculas de alto peso molecular como: polisacáridos, proteínas y lípidos, así como metabolitos de bajo peso molecular de las que destacan: lectinas, lactonas, terpenoides, alcaloides, esteroides y sustancias fenólicas (De Silva et al., 2012).

Estudios demuestran que poseen metabolitos como polisacáridos (β -glucano), proteínas, fibra dietética y muchas otras biomoléculas que promueven la formación de insulina y hormonas relacionadas que aseguran un funcionamiento metabólico saludable, lo que constituye una buena solución para controlar la diabetes y han sido valorizados como agentes hipoglucémicos y antidiabéticos potenciales (De Silva et al., 2012).

El polisacárido β -glucano en particular, puede restaurar las funciones de los tejidos pancreáticos, provocando un aumento en la producción de insulina por las células funcionales β , disminuyendo así los niveles de glucosa en sangre y también ha mejorado la sensibilidad de las células periféricas a la insulina circulante. Además, contienen enzimas que ayudan a descomponer azúcar o almidón en los alimentos y mejorar la resistencia a la insulina (Phan et al., 2015).

Los ácidos palmítico, oleico y linoleico dominan los perfiles de ácidos grasos en hongos. Estos ácidos grasos son importantes nutricionalmente y, se ha demostrado que promueve la generación de axones en el cuerpo estriado durante el desarrollo del cerebro; por lo que los extractos de hongos pueden desarrollarse como suplemento dietético para mejorar el cerebro y la salud cognitiva (Phan et al., 2015).

Algunas especies de Basidiomicetos son ricos en ergosterol. El ergosterol en las setas puede ser convertido en vitamina D₂ después de la exposición a luz ultravioleta. Investigaciones recientes sugirieron que los niveles más altos de vitamina D en la ingesta dietética se asoció con un menor riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer entre las mujeres mayores (Phan et al., 2015).

- Dentro de las especies que han sido reportadas por tener efectos hipoglucémicos tenemos (De Silva et al., 2012):
- *Agaricus bisporus*
- *Agaricus subrufescens*
- *Cordyceps sinensis*

- *Coprinus comatus*
- *Ganoderma lucidum*
- *Inonotus obliquus*
- *Phellinus linteus*
- *Pleurotus* sp.
- *Poria cocos*.
- *Sparassis crispa*

Varias especies del género *Pholiota* como el hongo de morera (*Pholiota adiposa*), posee enzimas trombolíticas y azúcares que poseen un alto efecto reductor de la glucosa en sangre, por lo que se puede usar como un agente hipoglucemiante oral, para el tratamiento y prevención de la diabetes. Así mismo, la especie *Pholiota adiposa* ha demostrado tener un efecto como antihipertensivo, reducción del colesterol, efectos antibióticos y actividades antitumorales (Kim, Bae, & Lee, 2014).

Para el género *Ganoderma* se puede encontrar en la literatura, un gran número de aplicaciones medicinales entre las que podemos destacar a la especie *Ganoderma lucidum*, el mismo que se caracteriza por la producción de un polisacárido denominado ganopolio, que actúa disminuyendo los niveles de glucosa en sangre en humanos (Rahman, Abdullah, & Aminudin, 2016).

Ganoderma lucidum y *G. applanatum* contienen polisacáridos de alto peso molecular que son fisiológicamente activos, siendo útiles en enfermedades como el Alzheimer, diabetes, rinitis, leucopenia, insomnio, úlceras duodenales, disfunción pulmonar y cardíaca (Zhang et al., 2011).

En el presente trabajo se analizaron hongos basidiomicetos haciendo énfasis en sus propiedades como antidiabéticos y en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer.

1.2. Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (OMS, 2016).

La insulina es una hormona que se necesita para convertir el azúcar, los almidones y otros alimentos en energía necesaria para la vida diaria y por lo tanto regula el azúcar en la sangre. Los niveles bajos de insulina y / o la resistencia a la insulina impiden que el cuerpo convierta la glucosa en glucógeno (sobre todo en el hígado), lo que a su vez hace difícil o imposible eliminar el exceso de glucosa de la sangre (De Silva et al., 2012).

Existen tres tipos principales de Diabetes (De Silva et al., 2012; “Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,” 2013):

- La diabetes tipo 1 (DT1), anteriormente conocida como insulina dependiente o juvenil, representa el 3% al 10% de los casos y se caracteriza por una deficiencia absoluta de secreción de insulina.
- Diabetes tipo 2 (DT2), anteriormente conocido como no insulina dependiente, representa del 85% al 90% de los casos, resulta de una condición en la cual las células no usan insulina adecuadamente (resistencia a la insulina), a veces combinada con una deficiencia absoluta de insulina.
- Y la diabetes gestacional, hiperglucemia que ocurre durante el embarazo y por lo general se resuelve después del parto, lo que representa el 2% al 5% de los casos, se desarrolla en mujeres embarazadas que nunca han tenido diabetes antes, y tienen un nivel alto de glucosa en la sangre durante el embarazo, puede ser más similar a la diabetes mellitus tipo 2 y es completamente tratable, pero requiere una supervisión médica cuidadosa durante todo el embarazo.

Además, existen otros tipos específicos de diabetes de etiología desconocida que incluyen: defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas, endocrinopatías, diabetes inducida por drogas o químicos, infecciones virales (coxsackievirus B, cytomegalovirus, adenovirus) y diabetes mediada por inmunomediadores (síndrome de stiff-man)(“Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,” 2013).

Se estima que en 2015 la diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes. Otros 2,2 millones de muertes fueron atribuibles a la hiperglucemia en 2012 (“OMS | Diabetes,” 2017).

En el presente estudio se hará referencia a la diabetes mellitus tipo II, debido a que los inhibidores enzimáticos tienen un potencial considerable como medicamentos para el

control de la enfermedad ya que evitan la digestión de carbohidratos (Fatmawati, Shimizu, & Kondo, 2011).

1.2.1. Diabetes Mellitus, no insulina dependiente. Tipo II.

La investigación más reciente sobre la fisiopatología de la diabetes tipo 2 se correlaciona con el concepto de activación del sistema inmune innato, en la cual se presenta infiltración de moléculas del sistema inmune en el tejido adiposo, desencadenando la activación de macrófagos, lo cual lleva a un estado inflamatorio crónico que aumenta de manera progresiva la resistencia a la acción de la insulina y está directamente relacionado con desarrollo de aterosclerosis (Barragán Torres et al., 2017; De Silva et al., 2012).

En la DM2 se observa agotamiento del páncreas por la acumulación de ácidos grasos libres que inducen la apoptosis de las células beta y conllevan la disminución en la secreción de insulina, acompañada a menudo con resistencia periférica a esta hormona, encargada de movilizar la glucosa al interior de la célula causando hiperglucemia. Debido a que la resistencia a la insulina se desarrolla progresivamente, el diagnóstico se realiza una vez la enfermedad está bastante avanzada y aparecen complicaciones, como la hipertensión arterial, cardiopatía isquémica o la insuficiencia renal (Barragán Torres et al., 2017).

La diabetes es una enfermedad crónica que no se puede curar por completo, sin embargo, la aparición o progresión de la enfermedad (DT2) puede ser prevenida o retrasada por la ingesta adecuada de alimentos y hábitos saludables. Los alimentos con bajo contenido en grasa y alto en fibra, evitan el aumento de peso, así como, realizar ejercicio físico y evitar factores agravantes tales como tabaquismo y un estilo de vida estresante y el sedentarismo (De Silva et al., 2012).

Los agentes hipoglucemiantes (agentes antidiabéticos), como insulina, metformina, tolbutamida, gliclazida, fenformina, troglitazona y rosiglitazona, exenatida constituyen el pilar fundamental para el tratamiento de la diabetes y son efectivos en el control de la glucemia. Sin embargo, pueden tener efectos secundarios nocivos, no alterar significativamente el curso de las complicaciones diabéticas; además, no existe suficiente conocimiento sobre el manejo farmacológico de la enfermedad. Por lo tanto, la búsqueda de sustancias con potencial antidiabético, extraídos de fuentes naturales -plantas y hongos medicinales- ha merecido una gran atención por parte de la comunidad científica (De Silva et al., 2012).

Tomando en cuenta los desafíos que representa controlar la DT2 a través de la dieta, el consumo de alimentos hipoglucémicos con propiedades inhibitorias de enzimas el tipo

amilasas y glucosidasas reciben más atención y se investigan ampliamente, ya que son enzimas clave que ayudan a la digestión de carbohidratos y desempeñan un papel vital en el control de los niveles de glucosa en sangre (Vadivel, Patel, & Biesalski, 2012).

1.3. Enfermedades Neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se definen como condiciones progresivas e incurables, secundario a la muerte neuronal. Dentro de una variedad de estas condiciones, las demencias envuelven un grupo significativo siendo la tercera condición neurológica más común, después de dolor de cabeza y evento cerebro-vascular (Chapa, 2018).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, cuyos síntomas incluyen pérdida de memoria y dificultades con el pensamiento o el lenguaje. La evidencia reciente en la investigación científica ha sugerido que la disfunción de las mitocondrias causada por el estrés oxidativo se asocia con la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EP) (Im, Nguyen, Choi, & Lee, 2016).

En el mundo entero, 47 millones de personas padecen demencia, y cada año se registran 9,9 millones de nuevos casos. La enfermedad de Alzheimer, representa entre un 60% y un 70% de los casos reportados (OMS, 2017).

1.3.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia y es un trastorno neurodegenerativo variable originado por cambios conformacionales en determinadas proteínas, por estrés oxidativo, anormalidades mitocondriales y procesos neuroinflamatorios. Se caracteriza por un daño progresivo en más de un área de cognición, incluyendo episodios de falta de memoria, cambios de humor y comportamiento, trastornos en el lenguaje, praxis y atención; siendo el síntoma temprano más común, la dificultad para recordar la información recién aprendida. El área del cerebro afectada es el prosencéfalo (cerebro anterior), la corteza y la amígdala, que son las áreas de aprendizaje, de memoria, de atención y de regulación (Singh et al., 2013).

Existen varias hipótesis con respecto al origen de la enfermedad, entre ellas: la hipótesis colinérgica, hipótesis amiloide, hipótesis de la proteína TAU, del calcio, e hipótesis del cambio isoprenoide (Howes, Fang, & Houghton, 2017).

De acuerdo a la hipótesis amiloide, la EA se desarrolla por el acumulo de placas amiloides en el sistema nervioso central (SNC) y proteínas *tau* anormales, las cuales forman ovillos neurofibrilares, lo que conlleva a una neurodegeneración progresiva.

Las anomalías de los neurotransmisores se caracterizan por déficits colinérgicos, pero otros sistemas de neurotransmisores, incluidos los glutamatérgicos y serotoninérgicos, también están alterados en el SNC. Otros mecanismos inflamatorios, daño oxidativo, apoptosis y neuroplasticidad atenuada también han sido implicados en la EA (Howes et al., 2017).

La deficiencia del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en el cerebro, amplifica la actividad de la acetilcolinesterasa. Este nivel disminuido del neurotransmisor causa alteración de la neurotransmisión colinérgica que conduce a la pérdida de habilidades intelectuales. Los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) pueden aumentar la transmisión colinérgica al evitar la hidrólisis de ACh, con lo que se obtiene más ACh en la sinapsis colinérgica. La acetilcolinesterasa produce inactivación de la acetilcolina y por ende la disminución de la transmisión del impulso nervioso. Esto hace que los inhibidores de AChE sean los medios más potentes para tratar los síntomas cognitivos de la EA (Im et al., 2016; Segura, Galindo, Rallo-Gutiérrez, Ceña, & Jordán, 2003).

Precisamente, ha sido la disminución en los niveles de acetilcolina la principal alteración de la neurotransmisión descrita en los pacientes con demencia tipo EA, por lo que gran parte de los estudios farmacológicos en el tratamiento de esta enfermedad se han dirigido hacia fármacos que incrementen los niveles de dicho neurotransmisor, o por el contrario detener los efectos de la acetilcolinesterasa en la que los fármacos más utilizados son los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa, o anticolinesterásicos, que son capaces de inhibir el catabolismo del neurotransmisor y aumentar la permanencia de éste en la sinapsis (Segura et al., 2003)

Como tratamiento de la EA se incluyen medicamentos que corrigen la función colinérgica en el SNC, para mejorar las funciones cognitivas mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Los medicamentos inhibidores de AChE son donepezilo, galantamina y rivastigmina; estos dos últimos medicamentos son derivados de productos naturales. Otro medicamento disponible utilizado para prevenir el deterioro y la muerte neuronal inducida por enfermedades nerviosas degenerativas, es la memantina, un fármaco antagonista no competitivo del receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), que funciona reduciendo la actividad anormal del cerebro (Howes et al., 2017).

Desafortunadamente, estos medicamentos están asociados con efectos secundarios tales como pérdida de apetito, mareos, dolor de cabeza, vómitos y diarrea. Por consiguiente, es necesaria la búsqueda de productos naturales potentes que inhiban selectivamente la actividad de AChE sin efectos secundarios (Im et al., 2016).

1.4. Mecanismos de Inhibición Enzimática

Como ya se ha mencionado anteriormente, la búsqueda de nuevas sustancias o compuestos que ejerzan la acción como inhibidores enzimáticos es importante, ya que proporcionan nuevos avances para prevenir o disminuir el desarrollo de enfermedades degenerativas como Alzheimer y enfermedades crónicas como Diabetes.

Las enzimas son proteínas que consisten en una o más cadenas polipeptídicas que actúan como catalizadores químicos acelerando las reacciones químicas a temperaturas fisiológicas al reducir su energía de activación. Poseen un sitio activo que proporciona un entorno químico único, formado por ciertos grupos de residuos de aminoácidos (conocidos también como grupos R o cadenas laterales). El sitio activo, es la región específica dentro de la enzima donde se une el sustrato y se produce la reacción (Rice University, 2013)

Cuando una enzima se une a su sustrato, se forma un complejo enzima-sustrato. Este complejo reduce la energía de activación de la reacción y promueve su rápida progresión en una o varias muchas formas. El sustrato es una molécula, o muchos tipos diferentes de moléculas que inhiben o promueven la función de la enzima, y existen diversos mecanismos para hacerlo (Rice University, 2013),

Generalmente un inhibidor es una sustancia capaz de disminuir la velocidad neta en una reacción, sin embargo, existen algunas variantes ya que la inhibición puede ser reversible e irreversible dependiendo de cómo se una a la enzima (Capparelli & Lodeiro, 2016).

La inhibición enzimática reversible, se da cuando el complejo enzima-sustrato puede disociarse y volver a actuar; mientras que en la irreversible se da cuando el inhibidor modifica o destruye la enzima y no recupera su actividad (Donoso, 2006).

1.4.1. Tipos de inhibición enzimática reversible

1.4.1.1. *Inhibición competitiva:*

Los inhibidores competitivos son comúnmente moléculas con una estructura parecida al sustrato, por lo cual son reconocidos y unidos a la enzima de manera similar, mientras que

otros pueden unirse al sitio activo y taponarlo impidiendo la unión del sustrato. Ver figura 1. A. Es así que compiten con el sustrato para vincularse al sitio activo (Bhagavan & Ha, 2011). Estas moléculas se unen a la enzima bloqueando el acceso del sustrato hacia el sitio activo (Capparelli & Lodeiro, 2016).

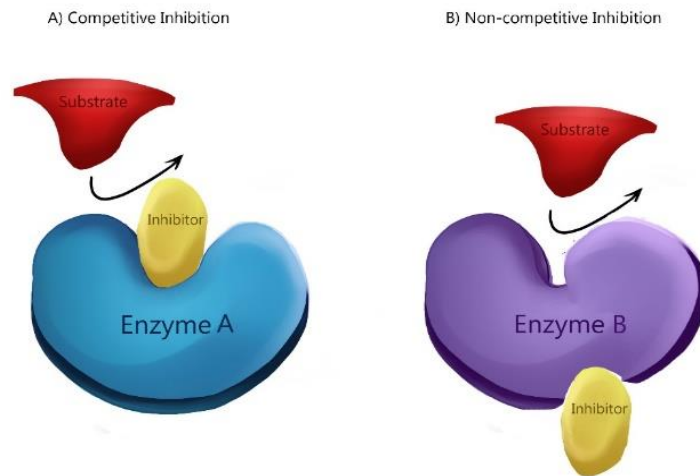


Figura 1. (A) Los inhibidores competitivos interfieren directamente con el sitio de unión de una enzima para garantizar que el sustrato no se ajuste. (B) Los inhibidores no competitivos se unen a un sitio alostérico de una enzima, cambiando su forma.

Fuente: Tomado de ("File:Competitive&NonCompetitive Enzyme Inhibition.jpg - Wikimedia Commons," 2016)

Elaboración: Wikimedia Commons, 2016.

1.4.1.2. Inhibición no competitiva:

En la inhibición no competitiva, el inhibidor generalmente no tiene algún parecido estructural con el sustrato, y se une a la enzima en un sitio distinto del sitio de unión del sustrato, como se observa en la figura 1. B. No existe competencia entre el inhibidor y el sustrato, y la inhibición no se puede superar al aumentar la concentración de sustrato (Bhagavan & Ha, 2011).

1.4.1.3. Inhibición acompetitiva:

El inhibidor (I) se une al complejo enzima-sustrato (ES), es decir, primero se une el sustrato al sitio activo de la enzima para que luego pueda unirse el inhibidor ya que solo el complejo ES posee el sitio adecuado para la unión. Como resultado se obtiene un complejo ESI inactivo (Capparelli & Lodeiro, 2016).

1.4.1.4. Otros tipos de inhibición

Algunas moléculas inhibidoras se unen a las enzimas en un lugar donde su unión induce un cambio conformacional que reduce la afinidad de la enzima por su sustrato. Este tipo de inhibición se llama inhibición alostérica (Figura 2). La mayoría de las enzimas reguladas alostéricamente están formadas por más de un polipéptido, lo que significa que tienen más de una subunidad proteica. Cuando un inhibidor alostérico se une a una enzima, todos los sitios activos en las subunidades de proteína se cambian ligeramente de manera que se unen a sus sustratos con menos eficacia. Hay activadores alostéricos e inhibidores. Los activadores alostéricos se unen a localizaciones en una enzima lejos del sitio activo, induciendo un cambio conformacional que aumenta la afinidad del (de los) sitio (s) activo (s) de la enzima por su (s) sustrato (s) (Rice University, 2013).

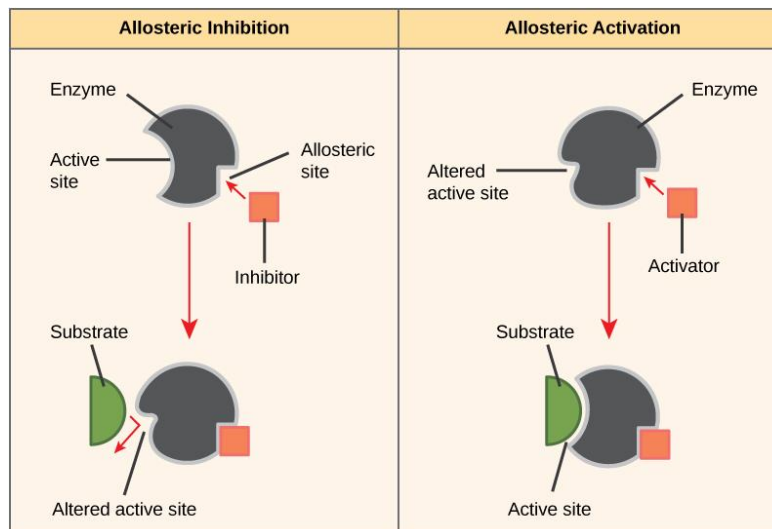


Figura 2. Los inhibidores alostéricos modifican el sitio activo de la enzima de modo que se reduce o previene la unión del sustrato. Por el contrario, los activadores alostéricos modifican el sitio activo de la enzima de modo que aumenta la afinidad por el sustrato.

Fuente: Tomado de (Rice University, 2013)

Elaboración: (Rice University, 2013)

1.4.1. Inhibición enzimática de alfa – amilasa y alfa – glucosidasa

Los carbohidratos (CHO) representan alrededor del 50% de las calorías ingeridas en la dieta de los adultos. Los diferentes tipos carbohidratos consumidos varían de acuerdo a la edad, los mismos que incluyen: disacáridos (principalmente lactosa, sacarosa, maltosa), almidón (forma dominante de almacenamiento de carbohidratos en vegetales) y glucógeno (en animales). Las fibras de la alimentación encontradas en los cereales, verduras y frutas, y los fructooligosacáridos como la inulina, presentes en ciertas verduras y alimentos procesados (por ejemplo, postres), no son digeribles (Wahbeh & Christie, 2011).

La descomposición del almidón comienza en la cavidad oral por la saliva que contiene α -amilasa, cuya actividad es limitada debido al breve tiempo de exposición antes de tragar. α -amilasa es inactivada por el ácido gástrico, sin embargo, puede estar presente alguna actividad dentro del bolo alimenticio. La α -amilasa salival aparece en el período neonatal y juega un papel más significativo en recién nacidos prematuros donde la producción de amilasa en el páncreas es baja (Wahbeh & Christie, 2011).

La mayoría de la digestión de almidón ocurre en el duodeno a través del efecto de la amilasa pancreática. La α -amilasa es una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces internos α -1, 4-glucosídicos en el almidón para producir productos como glucosa y maltosa. Es una metaloenzima cálcica, es decir, depende de la presencia de un co factor de metal para su actividad (Sundarram & Murthy, 2014; Wahbeh & Christie, 2011).

Hay 2 tipos de hidrolasas: endo-hidrolasa y exo-hidrolasa. Las endohidrolasas actúan en el interior de la molécula del sustrato, mientras que las exohidrolasas actúan en los extremos terminales no reductores. Por lo tanto, los residuos de glucosa terminales y los enlaces α -1, 6 no pueden escindirse por α -amilasa. El sustrato sobre el que actúa la α -amilasa es el almidón. El almidón es un polisacárido compuesto por dos tipos de polímeros: amilosa y amilopectina. La amilosa constituye el 20-25% de la molécula de almidón. Es una cadena lineal que consiste en unidades repetitivas de glucosa unidas por enlaces α -1, 4-glucosídicos. La amilopectina constituye 75-80% de almidón y se caracteriza por cadenas ramificadas de unidades de glucosa. Las unidades de glucosa sucesivas lineales están unidas mediante un enlace α -1, 4-glucosídico, mientras que la ramificación ocurre cada 15-

45 unidades de glucosa en las que están presentes enlaces glicosídicos α -1, 6. La composición de hidrolizado obtenida después de la hidrólisis del almidón depende en gran medida del efecto de la temperatura, las condiciones de hidrólisis y el origen de la enzima (Sundarram & Murthy, 2014).

La actividad de la amilasa produce una pequeña cantidad de moléculas de glucosa (Wahbeh & Christie, 2011).

La α -amilasa cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos en el almidón y libera los productos hidrolizados que constituyen el primer paso en la degradación enzimática de este polímero. Los inhibidores de la amilasa se pueden unir con los sitios reactivos de la enzima α -amilasa y alterar su actividad catalítica reduciendo el nivel de azúcar en la sangre (Vadivel et al., 2012).

Continuando con la síntesis de carbohidratos, las células que recubren el intestino delgado, liberan la α -glucosidasa que actúa catalizando la escisión de di y oligosacáridos de glucosa y su absorción en el intestino. El retraso de la absorción de glucosa podría tener un efecto beneficioso en el control de la glucemia postprandial. Por lo tanto, los inhibidores de α -glucosidasa pueden usarse para retardar la velocidad de absorción de glucosa en el intestino a través de la inhibición de la enzima (Vadivel et al., 2012).

Su mecanismo de acción se centra en impedir, mediante inhibición competitiva de la α -glucosidasa y α -glucosidasa-hidrolasas (glucoamilasas) -en los vellos intestinales de los enterocitos del borde dentado- la hidrólisis de disacáridos y oligosacáridos a monosacáridos antes de su absorción, retrasando la absorción de glucosa; es decir, se provoca una reducción en la producción de insulina postprandial mediante la atenuación del incremento de glucosa postprandial. Además, los inhibidores de α -glucosidasa disminuyen la secreción de polipéptidos inhibitorios gástricos y, aumentan la secreción del péptido parecido a glucagón 1 (GLP-1), (Samara Rodríguez-Rivera, Cuautle-Rodríguez, & Molina-Guarneros, 2017).

Acarbosa, miglitol y metformina son inhibidores de enzimas disponibles comercialmente para el tratamiento clínico de la diabetes tipo II. Sin embargo, se informa que estos fármacos causan diversos efectos secundarios como distensión abdominal, flatulencia y posiblemente diarrea, producto de una fermentación bacteriana anormal de carbohidratos no digeridos en el colon (debido a la inhibición excesiva de α -amilasa pancreática).

1.4.2. Inhibición enzimática de Acetilcolinesterasa

El cuerpo humano tiene dos distintas actividades de enzimas colinesterasa: acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) (Patočka, 2012).

El papel primordial de la acetilcolinesterasa (AChE) es la hidrólisis rápida del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas. La reacción de hidrólisis procede por ataque nucleófilo al grupo carbonilo, acilación de la enzima y liberación de Ch. Posteriormente, se hidroliza la enzima acilada dando ácido acético, regenerándose la enzima (Carretero, 2003).

AChE es una de las enzimas cruciales en el sistema nervioso central y periférico, por lo que la inhibición de colinesterasas, principalmente AChE, impide la degradación de la acetilcolina en las sinapsis del sistema colinérgico, siendo el principal mecanismo aceptado para la terapia de la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Patočka, 2012).

Varios inhibidores de AChE como agentes antidemencia han sido extraídos y caracterizados de varias plantas o microorganismos incluyendo *Umbilicaria esculenta*, té verde, *Securinega suffruticosa*, *Onosma hispida*, *Juglans regia*, la hierba china *Huperzia serrata*, etc. Sin embargo, los inhibidores de AChE como Galantamine, Rivastigmine, Donepezil, Tacrina y Memantina han sido únicamente aprobados por la FDA como medicamento para el tratamiento de las etapas iniciales de la EA (Kim et al., 2014).

Un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE), es un compuesto químico que impide la hidrólisis de acetilcolina, lo que aumenta su acción fisiológica (Im et al., 2016).

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa se clasifican en cuatro categorías:

- Inhibidores pseudoirreversibles (fisostigmina).
- Inhibidores irreversibles (metrifonato).
- Inhibidores tipo-análogos de estados de transición (yoduro de trifluoroacetofenona).
- Inhibidores reversibles (donepezilo y galantamina) (Carretero, 2003)

Actualmente, se investigan interesantes inhibidores naturales de la colinesterasa encontrados en algunos hongos. Se han aislado cuatro alcaloides beta-carbonilos: brunneinas A-C (VI-VIII) y 3- (7-hidroxi-9H-beta-carbonilo-1-yl) ácido propanoico (IX), que se encontraron en cuerpos fructíferos del hongo *Cortinarius brunneus* (Patočka, 2012).

De la familia Cortinaraceae, el hongo *Cortinarius infractus* Berk., posee dos alcaloides:

infractopicrina (X) y 10-hidroxi-infractopicrina (XI), que fueron aislados por Norbert Arnold y compañeros de trabajo del Instituto de Bioquímica de Plantas de Leibniz. Ambos compuestos muestran una inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa y poseen una mayor selectividad que la galantamina (Patočka, 2012).

Otra anti-colinesterasa natural de estructura química desconocida, se han observado en setas de la familia Agaricus. El extracto de acetato de etilo y el extracto de hexano de *Agaricus bitorquis*, así como el extracto de hexano de *Agaricus essettei* mostraron una actividad significativa anti-BuChE cercana a la del inhibidor galantamina (Patočka, 2012).

CAPÍTULO II.
DISEÑO METODOLÓGICO

2. Metodología

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Química, Sección de Química Básica y Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, empleando la siguiente metodología.

2.1. Recolección de la materia fúngica.

El área de recolección de las diferentes especies de hongos se encuentra en el sur del Ecuador en la provincia de Loja, en el bosque húmedo montano de los cantones Loja y Saraguro. Se realizó tres salidas de campo de las cuales las dos primeras fueron en el cerro Acacana, en la parroquia "San Lucas" del cantón Loja, con coordenadas $03^{\circ} 41' 35.580''\text{S}$, $079^{\circ} 14' 32.695''\text{W}$ y $03^{\circ} 41' 36.014''\text{S}$, $079^{\circ} 14' 16.818''\text{W}$ respectivamente.

La última recolección fue en un sitio conocido como Loma de Torre ubicado en el sector Inkapirca en el Cantón Saraguro con coordenadas $03^{\circ} 41' 03.296''\text{S}$, $079^{\circ} 13' 46.600''\text{W}$. Las tres recolecciones se llevaron a cabo desde el mes de abril hasta junio del año 2017 en los lugares especificados. En la Figura 3 se observa la ubicación geográfica de los lugares de recolección, estos datos se obtuvieron con los programas Arcgis, y Adobe ilustrador.

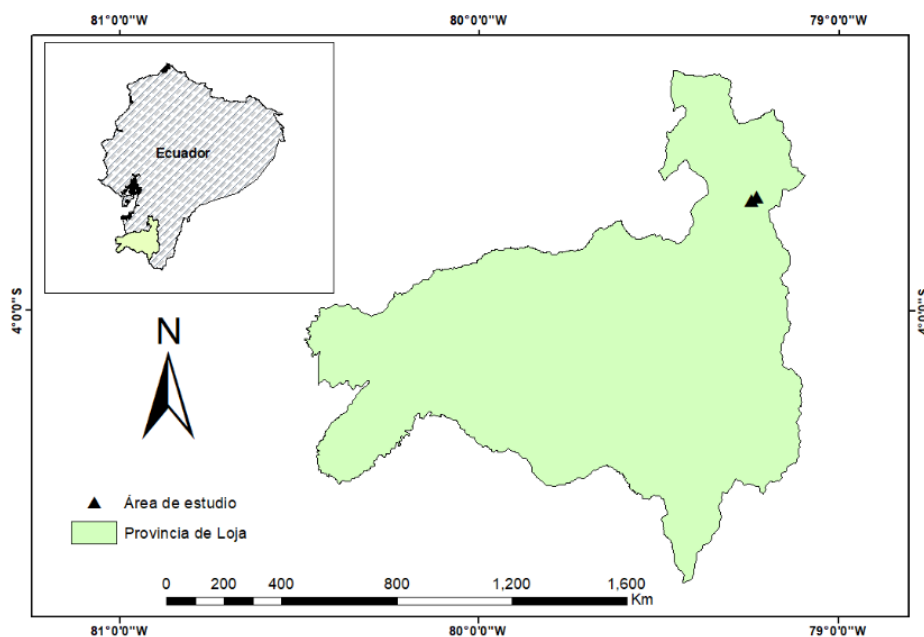


Figura 3. Ubicación de los lugares de recolección.

Fuente: Departamento de Biología.

Elaboración: La Autora.

Los hongos fueron recolectados en su hábitat natural (ver Figura 4) y se fotografiaron y empacaron para ser transportados a los laboratorios de la UTPL para su identificación taxonómica, la misma que fue realizada por el Ph.D. Darío Cruz, docente investigador del Departamento de Biología Básica y Aplicada de la UTPL. Posteriormente se dejó una muestra de cada ejemplar encontrado y se organizaron con códigos de recolección y se les asignó un voucher de depósito en el fungario, todos estos datos se detallan más adelante en la Tabla 1, Tabla 2, y Tabla 3.



Figura 4. Especimen basidiomiceto en su ambiente natural perteneciente al género *Pholiota*.

Fuente: Departamento de Biología.

Elaboración: La Autora.

2.2. Obtención de extractos

Una vez recolectados e identificados los hongos, se procedió a eliminar el exceso de agua secándolos a una temperatura de 40°C durante 48 horas en un desecador térmico marca Stockli. Se limpiaron y eliminaron las impurezas restantes (hojas, tierra y musgo) y finalmente, las muestras se trituraron y pesaron.

Se colocó las muestras trituradas en frascos Boeco, considerando que por cada 10 gramos de muestra, se adicionaron 200 mL de una mezcla de MeOH:H₂O en una proporción 8:2; luego se sometieron a maceración dinámica durante una hora, a 40°C y 100 r.p.m. Se siguió el mismo procedimiento por triplicado. Se filtró para separar los restos de la materia orgánica del extracto.

El extracto resultante se concentró a presión reducida en un rotavapor a una temperatura de 35 °C. Una vez seco el extracto se resuspendió en metanol, obteniéndose un residuo insoluble, con lo que se generaron dos fracciones. La fracción soluble en metanol y una fracción más polar soluble en agua. La fracción soluble en agua se liofilizó, y se almacenó al igual que la fracción metanólica en un congelador a una temperatura de – 70 °C.

2.3. Ensayos de Actividad Enzimática

2.3.1. Preparación de las muestras

Se pesaron 10 mg de cada uno de los extractos y se disolvieron en metanol o agua, de acuerdo a la solubilidad de la muestra. En caso de obtener un precipitado al momento de disolver, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 5 000 r.p.m. Las muestras resultantes se emplearon en los sistemas enzimáticos de alfa –glucosidasa, alfa –amilasa y acetilcolinesterasa. En caso de obtener inhibición enzimática completa con este sistema de dosificación, se emplearon varias diluciones de acuerdo a las curvas de inhibición obtenidas.

2.3.2. Ensayo de inhibición frente al sistema alfa - Glucosidasa

Para medir la capacidad inhibitoria de los extractos frente a la enzima α -glucosidasa se utilizó placas de cultivo celular de 96 pocillos marca Trueline, en donde como control positivo (inhibidor) de la prueba se utilizó acarbose (Acarbose, SIGMA A8980, St Louis Mo.) a una concentración de 5mg por mililitro de agua. Se colocó en cada pocillo 75 μ L de Buffer Salino Fosfato (Phosphate Buffered Saline, SIGMA P4417) con pH de 7.4 y se mezcló con 20 μ L de una solución de enzima (α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA G5003) que contiene 0.15 U/mL en PBS pH 7.4 y seguidamente se agregó 5 μ L de la solución del extracto a analizar. La placa se incubó a 37 °C y en agitación durante 1 min. Para medir la actividad se utilizó 4-nitrofenil- α -D-Glucopiranosido (4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside, SIGMA N1377) como sustrato (5mM disuelto en PBS pH 7.4) y se registró la cantidad de p- Nitrofenol liberado, que es directamente proporcional a la absorbancia, la cual se midió en un espectrofotómetro lector de microplacas EPOCH 2 (BIO TEK®) a una longitud de onda de 405 nm durante 60 minutos y realizando controles de la absorbancia cada 5 minutos. La prueba se realizó por triplicado.

El porcentaje de inhibición de las muestras se obtuvo mediante la fórmula descrita por Choi, Lee, & Kim, (2015):

$$\% \text{ de Inhibición} = \left[\frac{A_o - A_s}{A_o} \right] \times 100$$

Donde, A_o (control), es la absorbancia registrada por la actividad enzimática, A_s es la absorbancia registrada de la actividad enzimática con la muestra. Se utilizó Acarbosa (inhibidor) como control positivo. El valor de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) se calculó mediante el modelo de ajuste de curva en el programa estadístico IBM-SPSS (Estadística 20). El protocolo para el desarrollo del método se encuentra en el Anexo 1.

2.3.3. Ensayo de inhibición frente al sistema alfa – Amilasa

Se utilizó el mismo inhibidor del ensayo anterior, la Acarbosa. Se preparó almidón como sustrato disolviendo 1 gramo en una solución de 50 mL de NaOH 0.4 M y se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Se dejó enfriar y se ajustó el pH a 7 con HCl 2M, luego se aforó con agua destilada a 100 mL. En los pocillos de la placa se colocó 35 μ L de PBS, 20 μ L de sustrato, 5 μ L de la solución del extracto y 20 μ L de la solución de la enzima (α -Amylase, Type VI-B: from Porcine Pancreas. SIGMA A3176) con una concentración de 50 μ g/mL, esto se preincubó durante 1 minuto a 37 °C. Finalmente se detuvo la reacción agregando 50 μ L de HCL 0.1 M, seguidamente se añadió 150 μ L de solución de yodo 1mM (0.5 mM de I_2 y 0.5mM de KI) preparado en proporción 1:1. La absorbancia se midió espectrofotométricamente en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIO TEK®) a 580 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula descrita por Kusano et al.,(2011):

$$\% \text{ de Inhibición} = \left[1 - \frac{(Abs2 - Abs 1)}{(Abs 4 - Abs 3)} \right] \times 100$$

Donde, Abs 1 es la absorbancia de la muestra más la solución de PBS, enzima y sustrato, la Abs 2 es la absorbancia control de la muestra más el almidón, Abs 3 es la absorbancia de la solución incubada de la enzima amilasa con el almidón y la Abs 4 es el control de la solución incubada que contiene solo almidón.

El cálculo de la CI_{50} se realizó con el programa estadístico IBM –SPSS (Estadística 20) mediante el modelo de ajuste de datos.

El protocolo para el desarrollo de este método se encuentra en el Anexo 2.

2.3.4. Ensayo de inhibición frente al sistema Acetilcolinesterasa

Para la detección de la inhibición de AchE se utilizó DTNB 3 mM (2-Nitro-5-thiocyanatobenzoic acid, SIGMA D218200) como indicador de la reacción de hidrólisis. En

la placa de 96 pocillos se agregó 40 µL de Buffer C Tris pH 8 (suplementado por MgCl₂.6H₂O 0,08M, NaCl 0.4 M y Tris 200 mM, en proporción 1:1:1, ajuste de pH con HCl 2M), 20 µL del sustrato Acetiltiocolina 15 mM (Acetylthiocholine iodide, SIGMA -01480), 20 µL de la solución del extracto y 100 µL de DTNB (1.19 mg/ mL Buffer C). La placa se preincubó durante 3 minutos a 25 °C y se agregó 20 µL de la enzima (0.25 U/ mL en Buffer C, Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*, SIGMA C3389-10KU).

La reacción se monitoreó en un espectrofotómetro EPOCH 2 (BIO TEK®) a una longitud de onda de 412 nm; a 25 °C durante 15 minutos, realizando controles de absorbancia cada minuto.

Se calculó en porcentaje de inhibición mediante la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \left[\left(\frac{A_s}{A_o} \right) \right] \times 100$$

Donde, A_s es la absorbancia registrada por la actividad enzimática con la muestra analizada, mientras A_o es el control de la actividad enzimática. Este método se puede visualizar en el anexo 3.

CAPÍTULO III.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Hongos encontrados

De la materia fúngica recolectada, se identificaron los siguientes 20 géneros y especies de hongos, los mismos que se etiquetaron con el código de recolección y el voucher para su almacenamiento en el fungario HUTPL. Todos estos datos se detallan a continuación de acuerdo al lugar de recolección en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Especímenes recolectados en el cerro Acacana, parroquia San Lucas del cantón Loja.

Nº	Orden	Género/ especie	Código	Voucher
1.	Agaricales	<i>Pholiota</i> sp.	EM-773	HUTPL-1781
2.	Polyporales	<i>Ganoderma</i> cf. <i>amazonense</i>	EM-774	HUTPL-1782
3.	Russulales	<i>Stereum</i> sp.	EM-775	HUTPL-1783
4.	Agaricales	<i>Oudemansiella platensis</i>	EM-777	HUTPL-1785
5.	Polyporales	<i>Laetiporus</i> sp.	EM-778	HUTPL-1786

Fuente: La Autora.

Elaboración: La autora.

Tabla 2. Especímenes recolectados en Mollón, parroquia San Lucas en el cantón Loja.

Nº	Orden	Género/ especie	Código	Voucher
6.	Polyporales	<i>Laetiporus</i> cf. <i>sulphureus</i> .*	EM-562	--
7.	Agaricales	<i>Omphalina</i> sp.	EM-779	HUTPL-1787
8.	Agaricales	<i>Pleurotus ostreatus</i>	EM-780	HUTPL-1788
9.	Agaricales	<i>Macrolepiota procera</i>	EM-781	HUTPL-1789
10.	Agaricales	<i>Galerina</i> sp.	EM-782	HUTPL-1790
11.	Agaricales	<i>Gerronema</i> sp.	EM-783	HUTPL-1791
12.	Polyporales	<i>Laetiporus</i> sp.**	EM-785	HUTPL-1793
13.	Polyporales	<i>Trametes</i> sp.	EM-787	--

*La especie *Laetiporus* cf. *sulfureus* Código EM -562, se recolectó en Zamora Huayco, provincia de Loja el 25 de junio del año 2015, y ***Laetiporus* sp. Código EM -785 en Inkapirca el 11 de Mayo del año 2017.

Fuente: Departamento de Biología.

Elaboración: La Autora

Tabla 3. Especímenes recolectados en Loma de Torre, sector Inkapirca del cantón Saraguro.

Nº	Orden	Género/ especie	Código	Voucher
14.	Polyporales	<i>Trametes versicolor</i>	EM -792	HUTPL- 1800
15.	Hymenochaetales	<i>Trichaptum</i> sp.	EM -794	HUTPL-1802
16.	Agaricales	<i>Trogia</i> cf. <i>brevipes</i>	EM -797	HUTPL-1805
17.	Polyporales	<i>Lentinus crinitus</i>	EM -800	HUTPL-1808
18.	Agaricales	<i>Schizophyllum commune</i>	EM- 801	HUTPL-1809
19.	Russulales	<i>Stereum</i> cf. <i>hirsutum</i>	EM -802	HUTPL-1810
20.	Agaricales	Cf. <i>Entoloma</i> sp.	EM -803	HUTPL-1811

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora

Ecuador por su alta biodiversidad por unidad de superficie es considerado un país megadiverso, pero el conocimiento acerca de la diversidad fúngica y sus aplicaciones en el ámbito medicinal aún es muy escaso. Se estima que en el país existen alrededor de 96000 especies de hongos, pero según reportes analizados hay algo menos de 4000. Si bien ha habido algunos estudios en las zonas de Pichincha, Quito, Yasuní o Cuyabeno, poco o nada se sabe de lo que hay al sur del país; sin embargo, la diversidad de ecosistemas en esta área es grande. Además de bosque amazónico en la región oriental, hay bosque seco tropical relativamente conservado en el suroeste en los límites con Perú. Otras formaciones de interés son el bosque montano tropical y de niebla, así como ecosistemas de páramo y subpáramo en la zona andina (Pérez Daniels, 2015).

El cantón Saraguro conocido como la “tierra del maíz”, se encuentra a 64 Km al norte del cantón Loja, siendo ambos cantones pertenecientes a la provincia de Loja. Destacan por poseer áreas de importancia para la conservación de la biodiversidad debido a la formación de bosques de niebla montano y el conocido páramo andino que constituyen las parroquias San Lucas y el Tablón; esta última, perteneciente al cantón Saraguro. En San Lucas, se ubican Inkapirca y cerro Acacana que constituyen los lugares de recolección debido al poco impacto que genera la intervención antrópica (Quizhpe et al., 2017).

Por los diferentes ecosistemas que conforman el cantón Saraguro, existe un sin número de flora y fauna silvestres en sus bosques y páramos, siendo la flora un determinante principal de la medicina tradicional (Gualán & Vallejo, 2015).

Según la (OMS 2010), la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.

Es decir, que la medicina tradicional, se basa en la aplicación de conocimientos y técnicas obtenidas de generaciones ancestrales para mantener el equilibrio corporal; estas prácticas utilizan animales y productos herbarios que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, incluyendo la combinación de todos estos elementos (Gualán & Vallejo, 2015; OMS, 2010)

Las preparaciones con materiales vegetales no solo se utilizan con fines medicinales y se incluyen dentro de la dieta, como es el caso de la chicha hueso de oso, que se la prepara con un hongo que se desarrolla en el bagazo de la caña de azúcar (Castillo & Noriega, 2012).

Varias especies encontradas en Ecuador pertenecen al filo de los basidiomicetos, destacándose por su singularidad, belleza o rareza, las especies que pertenecen al orden Agaricales (*Anthracophyllum lateritium*, *Campanophyllum proboscideum*, *Favolaschia aurantiaca*, *Hydropus nigrita*, *Hygrocybe aphylla*, *Hymenogloea papyracea*, *Leucopaxillus brasiliensis*). Otras especies del orden Phallales como *Lysurus periphragmoides* y *Phallus indusiatus*, se destacan por poseer formas y colores llamativos, mientras que los hongos menos comunes son los que pertenecen a los órdenes Telephorales (*Sarcodon thwaitesii*), Boletales (*Neopaxillus echinospermus*), Trechisporales (*Hydnodon thelephorus*) y Pezizales (*Cookeina tricoloma*) (Pérez Daniels, 2015).

Estudios realizados por Andrade, et al., (2012) en el cantón Saraguro, revelaron que existen especies con cuerpos fructíferos comestibles que son utilizados por los indígenas saraguros; estas especies comprenden: *Lentinula* cf. *aciculospora*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus* cf. *tricholoma* y *Suillus luteus*, mientras que *Bovista plumbea*, *Ganoderma applanatum* y *Stereum ostrea* son hongos medicinales.

Existen también hongos saprobios asociados a especies arbóreas como el Aliso (*Alnus acuminata*) de las que comúnmente se encuentran: *Cyclocybe aegerita*, *Laccaria laccata*, *Suillus luteus*, *Tapinella panuoides* o *Schizophyllum commune* (Pérez Daniels, 2015).

Todos los hongos encontrados en este estudio, pertenecen a la división Basidiomycota, siendo predominantes los que corresponden al orden Agaricales (10 hongos), seguido de los órdenes Polyporales (7 hongos), Russulales (2) e Hymenochaetales (1).

3.1. Extractos obtenidos de la materia fúngica

A continuación en la Tabla 4 se detalla los rendimientos de los extractos obtenidos a partir de las muestras de hongos basidiomicetos que fueron sometidos al disolvente MeOH – H₂O en una proporción 8:2.

Se observa que los mayores rendimientos se obtuvieron a partir de los géneros *Galerina sp.* 46,68 %, *Cf. Entoloma* 40,35%, *Gerronema* 33,67%, y *Omphalina sp.* 32,48%, con valores que fluctúan desde 30% hasta 46%. Figura 5.

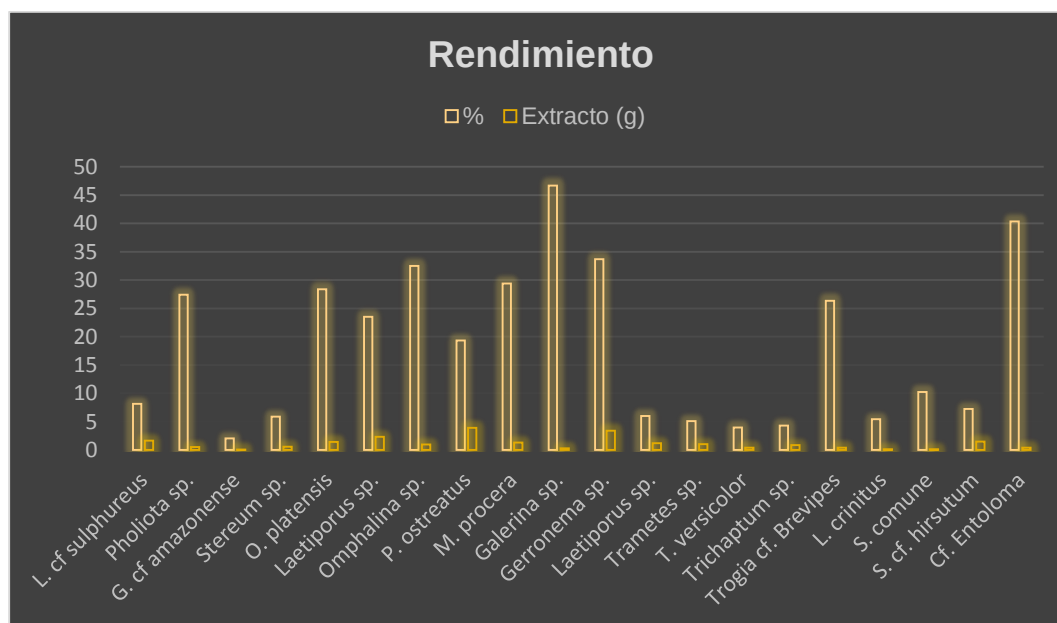


Figura 5. Porcentaje de rendimientos de los extractos.

Fuente: La Autora.

Elaboración: La Autora.

Según Wasser S.p.,2002, se pueden obtener procedimientos extractivos exitosos aplicando una metodología que elimine sustancias de bajo peso molecular con la utilización de etanol al 80%, seguido de tres procesos extractivos en agua a 100°C, aplicando oxalato de amonio (5%) e hidróxido de sodio (20%). La extracción con agua a 100°C garantiza la obtención de polisacáridos altamente solubles en agua. En el presente estudio, las condiciones extractivas en metanol al 80% y 45°C arrojaron extractos que podrían contener sustancias de bajo peso molecular (debido a la polaridad similar con etanol al 80%); así como, algunos polisacáridos solubles en agua, ya que la disolución en metanol, para algunos de los hongos empleados no fue completa, debiéndose realizar la disolución de los mismos en agua.

Los hongos Basidiomycetos contienen polisacáridos biológicamente activos que se pueden obtener de sus cuerpos fructíferos, micelio cultivado y caldo de cultivo. Estos polisacáridos son de diferente composición química, y la mayoría pertenece al grupo de los β -glucanos, que se caracterizan por tener enlaces β - (1 $\rightarrow$ 3) en la cadena principal y, puntos de ramificación con enlaces β - (1 $\rightarrow$ 6) adicionales que son necesarios para su actividad antitumoral. La mayoría de la evidencia clínica de actividad antitumoral proviene de los polisacáridos comerciales lentinano, PSK (krestin) y esquizofilano. Los glucanos de alto peso molecular parecen ser más efectivos que los de bajo peso molecular siendo principalmente solubles en agua (S., 2002).

El mayor componente de los hongos es el agua, por lo que luego de un proceso de secado resulta en una baja proporción de materia orgánica seca (MOS), entre 80-140 g/kg, (Díaz Cruz, 2015) lo que dificulta la obtención de una cantidad representativa de extracto (Tabla 4), para posteriores estudios cromatográficos. Además, poseen bajos niveles de azúcares que varían entre especies, siendo los más encontrados los monosacáridos y sus derivados, oligosacáridos y polisacáridos (glucanos) así como azúcares alcohol que son digestibles parcialmente o indigeribles, como el manitol y la quitina. En conjunto, todos estos carbohidratos constituyen la mitad del peso seco de los hongos.

Según Cruz, 2015, la exposición al calor (cocción) del material fúngico, favorece la hidrólisis de polisacáridos y la liberación de azúcares, por lo que en este estudio al haber sometido las muestras a un proceso térmico, es posible que los extractos presenten una mayor cantidad de azúcares.

De los carbohidratos más importantes en las setas, la quitina es un polisacárido con función estructural que contiene nitrógeno y es insoluble en agua. Se caracteriza por tener enlaces

β -1,4 con unidades de N-acetilglucosamina. Se encuentra en un 80-90% en las paredes celulares de los hongos, con un contenido de 7.6-98.6 g/kg MOS. La quitina es indigerible, y aparentemente disminuye la digestibilidad de otros componentes (Díaz Cruz, 2015).

El calor produce pérdida de humedad y por ende la concentración de nutrientes, pero los mismos se pueden perder debido a degradación térmica y reacciones químicas entre los constituyentes (Díaz Cruz, 2015).

Dentro de los carbohidratos tenemos también la fibra y otros polisacáridos estructurales, tales como α y β -glucanos, quitina, hemicelulosas, mananos y sustancias pécticas. Estos polisacáridos tienen potencial antioxidante, antitumoral, antiviral, y propiedades inmunomoduladoras. Los datos sobre la fibra dietética son limitados, pero se han observado contenidos entre 40-90 y 220-300 g/kg MS de fibra soluble e insoluble, respectivamente (Díaz Cruz, 2015)

Tabla 4. Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos en relación al peso seco de cada muestra y el extracto obtenido.

Código	Nombre	Peso muestra (g)	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
EM-562	<i>Laetiporus cf. sulphureus</i>	20,1689	1,6472	8,17
EM-773	<i>Pholiota sp.</i>	2,0071	0,5506	27,43
EM-774	<i>Ganoderma cf. Amazonense</i>	5	0,1037	2,06
EM-775	<i>Stereum sp.</i>	10,1264	0,5976	5,90
EM-777	<i>Oudemansiella platensis</i>	5,1347	1,4562	28,36
EM-778	<i>Laetiporus sp.</i>	10,0308	2,3569	23,50
EM-779	<i>Omphalina sp.</i>	3,0129	0,9785	32,48
EM-780	<i>Pleurotus ostreatus</i>	20,16	3,9022	19,36
EM-781	<i>Macrolepiota procera</i>	4,4994	1,322	29,38
EM-782	<i>Galerina sp.</i>	0,6797	0,3173	46,68
EM-783	<i>Gerronema sp.</i>	10,0484	3,3832	33,67

EM-785	<i>Laetiporus</i> sp.	20,1045	1,2065	6,00
EM-787	<i>Trametes</i> sp.	20,1618	1,0243	5,08
EM-792	<i>Trametes versicolor</i>	10,2405	0,4084	3,99
EM-794	<i>Trichaptum</i> sp.	20,1779	0,8666	4,29
EM-797	<i>Trogia</i> cf. <i>Brevipes</i>	1,6811	0,443	26,35
EM-800	<i>Lentinus crinitus</i>	2,789	0,1518	5,44
EM-801	<i>Schizophyllum comune</i>	1,4855	0,1525	10,27
EM-802	<i>Stereum</i> cf. <i>Hirsutum</i>	20,22	1,4631	7,24
EM-803	Cf. <i>Entoloma</i> sp.	1,0553	0,4258	40,35

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora

Estudios de algunos géneros de hongos, informaron resultados diferentes debido al contenido de compuestos bioactivos (que son responsables de las actividades antioxidantes, inmunomoduladoras, anticancerígenas, etc), ya que las concentraciones de estas sustancias se ven afectadas por las diferencias en cepa, nutrientes, cultivo, etapa de desarrollo, edad de los hongos (frescos o viejos), condiciones de almacenamiento y el método de extracción, especialmente, el tipo de solvente usado en la extracción (Boonsong, Klaypradit, & Wilaipun, 2016). En conjunto, todos estos factores determinan el valor funcional que se les atribuye a los hongos, de acuerdo a los requerimientos que se desee obtener.

3.2. Actividad enzimática de los extractos

3.2.1. Actividad inhibitoria frente a α - Glucosidasa

La actividad inhibitoria de los extractos evaluados se presenta en la tabla 5, todos los extractos probados con la fracción acuosa no presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 50 % por lo que no se presenta la CI_{50} de los mismos.

En el presente estudio se utilizó el inhibidor acarbosa, que exhibe un porcentaje de inhibición del 80 % a una concentración de 1290 μ M, mientras que la CI_{50} se encuentra a 377 μ M, estos datos son similares a los reportados por Torres-Naranjo et al., (2016).

Los hongos que presentaron una fuerte actividad inhibitoria (CI_{50}) frente al sistema de alfa-glucosidasa fueron, *Laetiporus* sp. (EM-562) y *Gerronema* sp. (EM-783), mientras que aquellos que presentaron una actividad moderada y comparable al inhibidor Acarbosa fueron *Stereum* cf. *Hirsutum*, (EM – 802), *Pholiota* sp. (EM-773) y *Laetiporus* sp. (EM-785) con valores de CI_{50} entre 346 $\mu\text{g/mL}$ y 1944 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 5).

Los demás extractos probados presentaron porcentajes de inhibición inferiores al 50% a la dosis más alta probada en el ensayo que fue de 2mg/mL.

Tabla 5. Porcentaje de Inhibición y CI_{50} de los extractos probados frente al sistema α -glucosidasa

Código	Género/Especie	Fracción Metanólica		Fracción Acuosa
		% Inh $\pm$ eem [†]	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ eem [†]	% Inh $\pm$ eem
EM -562	<i>Laetiporus</i> cf. <i>sulphureus</i>	-	47,55 $\pm$ 3,49	24.41 $\pm$ 0.45
EM-773	<i>Pholiota</i> sp.	-	1944,37 $\pm$ 242,67	16.88 $\pm$ 0.23
EM-774	<i>Ganoderma</i> cf. <i>Amazonense</i>	22,93 $\pm$ 0,51	-	47.47 $\pm$ 0.54
EM-775	<i>Stereum</i> sp.	21,84 $\pm$ 0,98	-	19.82 $\pm$ 0.06
EM-777	<i>Oudemansiella platensis</i>	21,26 $\pm$ 1,76	-	22.89 $\pm$ 0.06
EM-778	<i>Laetiporus</i> sp.	10,88 $\pm$ 0,2	-	11.70 $\pm$ 0.27
EM-779	<i>Omphalina</i> sp.	-	-	11.89 $\pm$ 0.14
EM-780	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-	4.61 $\pm$ 0.13
EM-781	<i>Macrolepiota procera</i>	-	-	26.77 $\pm$ 0.10
EM-782	<i>Galerina</i> sp.	14,69 $\pm$ 1,87	-	36.16 $\pm$ 0.52
EM-783	<i>Gerronema</i> sp.	-	56,42 $\pm$ 5,99	14.12 $\pm$ 0.74
EM-785	<i>Laetiporus</i> sp.	-	538,84 $\pm$ 89,05	32.36 $\pm$ 0.72
EM-787	<i>Trametes</i> sp.	9,43 $\pm$ 1,15	-	26.67 $\pm$ 0.21
EM-792	<i>Trametes versicolor</i>	25,87 $\pm$ 0,84	-	22.89 $\pm$ 0.50

EM-794	<i>Trichaptum</i> sp.	34,28 ± 0,48	-	25.25 ± 0.79
EM-797	<i>Trogia</i> cf. <i>Brevipes</i>	5,48 ± 0,49	-	43.57 ± 0.24
EM-800	<i>Lentinus crinitus</i>	10,1 ± 0,77	-	41.14 ± 0.44
EM-801	<i>Schizophyllum comune</i>	7,15 ± 0,76	-	35.50 ± 0.69
EM-802	<i>Stereum</i> cf. <i>Hirsutum</i>	-	346,09 ± 29,49	19.21 ± 0.74
EM-803	Cf. <i>Entoloma</i> sp.	-	1306,7 ± 147,44	10.039 ± 0.24
Acarbosa			377 µM (243,39 µg/mL)	

† % Inh. Porcentaje de inhibición. Los datos representan el promedio de tres determinaciones y tres réplicas, y su error estándar de la media (eem), n=9.

‡ CI₅₀. Concentración inhibitoria media.

Fuente: La Autora.

Elaboración: La Autora.

En el ensayo realizado por Im, Nguyen, Choi, & Lee, (2016), se demostró que la actividad inhibitoria de los extractos acuosos y metanólicos de *Trametes pubescens* variaron entre los rangos de 36.64% a 51.24%, y de 36.88% a 53.05% a una dosis entre 0,125 a 2,0 mg/mL, respectivamente. Mientras que el inhibidor, Acarbosa, el fármaco de referencia, exhibió la mayor actividad inhibitoria a una dosis entre 0,125 a 2,0 mg/mL, que oscila entre 37,27% y 81,81% de inhibición. En nuestro ensayo las especies pertenecientes al género *Trametes*, no presentaron porcentajes de inhibición significativos con una dosis de 2 mg/mL (Tabla 5), sin embargo la CI₅₀ reportada de la Acarbosa alcanzó un 80% de inhibición a una dosis de 5 mg/mL.

3.2.2. Actividad inhibitoria frente a Alfa – Amilasa

Para nuestro ensayo se empleó el mismo inhibidor que se empleó en la prueba glucosidasa, la acarbosa, que alcanzó una inhibición completa del 100% con una dosis de 312,5 µg/mL mientras que la CI₅₀ está en 10 uM, estos datos se comparan con un ensayo realizado por Torres-Naranjo et al., (2016).

Los extractos de los hongos que presentaron una buena actividad inhibitoria con valores de CI₅₀ entre 0,042 y 0,73 µg/mL son: *Laetiporus* cf *sulphureus* (EM -562), *Ganoderma* cf *amazonense* (EM-774), *Stereum* sp. (EM-775), *Oudemansiella platensis* (EM-777), *Macrolepiota procera* (EM-781), *Gerronema* sp (EM-783), *Laetiporus* sp. (EM-785),

Trametes versicolor (EM -792), *Schizophyllum comune* (EM- 801), *Stereum cf. Hirsutum* (EM -802) y *Cf. Entoloma sp.* (EM -803). (Ver Tabla 6), siendo su actividad mucho más elevada que el inhibidor comercial Acarbosa, que presenta una CI_{50} de 6,45 $\mu\text{g/mL}$ (10 μM).

El resto de extractos analizados, demostraron una actividad inhibitoria moderada con valores que varían entre 22, 08% y 49,09%, a la dosis más alta probada (2 mg/mL) (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de inhibición e CI_{50} de los extractos frente al sistema de Alfa – amilasa.

Código	Nombre	% Inh	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	eem [†]
EM -562	<i>Laetiporus cf. sulphureus</i>	-	0,042	0,053
EM-773	<i>Pholiota sp.</i>	45,61	-	0,009
EM-774	<i>Ganoderma cf amazonense</i>	-	0,68	0,018
EM-775	<i>Stereum sp.</i>	-	0,66	0,054
EM-777	<i>Oudemansiella platensis</i>	-	0,17	0,044
EM-778	<i>Laetiporus sp.</i>	48,48	-	0,046
EM-779	<i>Omphalina sp.</i>	42,861	-	0,014
EM-780	<i>Pleurotus ostreatus</i>	30,38	-	0,012
EM-781	<i>Macrolepiota procera</i>	-	0,72	0,035
EM-782	<i>Galerina sp.</i>	40,66	-	0,013
EM-783	<i>Gerronema sp.</i>	-	0,23	0,050
EM-785	<i>Laetiporus sp.</i>	-	0,60	0,033
EM-787	<i>Trametes sp.</i>	49,59	-	0,004
EM -792	<i>Trametes versicolor</i>	-	0,70	0,039
EM -794	<i>Trichaptum sp.</i>	43,05	-	0,023
EM -797	<i>Trogia cf. Brevipes</i>	22,08	-	0,020

EM -800	<i>Lentinus crinitus</i>	31,18	-	0,021
EM- 801	<i>Schizophyllum comune</i>	-	0,73	0,043
EM -802	<i>Stereum cf. Hirsutum</i>	-	0,51	0,031
EM -803	Cf. <i>Entoloma</i>	-	0,37	0,059

† Los datos representan el promedio de tres determinaciones y tres réplicas, y su error estándar de la media n=9.

Fuente: La Autora.

Elaboración: La Autora

En un ensayo realizado por Im, Nguyen, Choi, & Lee, (2016) con la especie *Trametes pubescens*, se obtuvieron extractos acuosos y metanólicos que demostraron efectos inhibidores con una variación de 27.75% a 69.46%, y de 10.05% a 53.82% a 0.125-2.0 mg/mL, respectivamente. En nuestro ensayo se analizó el extracto metanólico, con una dosis de 2mg/mL, en donde la especie *Trametes* sp. (EM -787) presentó una actividad comparable con el del estudio realizado, mientras que *T. versicolor* exhibió una IC₅₀ de 0,70 (Tabla 6).

Sin embargo, la Acarbosa, mostró una excelente capacidad inhibidora de la α -amilasa, que varía desde 40.61% a 89.91% a 0.125-2.0 mg / mL. En nuestro ensayo obtuvimos una inhibición completa empleando el mismo inhibidor y a una concentración de 0,3125 mg/mL

3.2.3. Actividad inhibitoria frente a Acetilcolinesterasa

La enzima acetilcolinesterasa (AChE), conocida como acetilhidrolasa, cataliza la hidrólisis de la acetilcolina, uno de los neurotransmisores que se encuentran en las sinapsis cerebrales colinérgicas, finalizando la transmisión de la sinapsis. Los niveles bajos de acetilcolina pueden conducir a trastornos neurológicos como enfermedad de Alzheimer, demencia senil y ataxia (Im et al., 2016).

En nuestro estudio, se probaron los efectos anticolinérgicos de los extractos metanólicos de las 20 muestras de hongos a una concentración máxima de 2 mg/ mL, donde se obtuvo que el mayor porcentaje de inhibición fue para las especies *Trametes* sp. (EM -787), *Ganoderma cf amazonense* (EM -774), *Lentinus crinitus* (EM -800) y *Pholiota* sp. (EM -773) con una variación del 40,55 % a 44,59%, (ver Tabla 7). Estos valores no son significativos en comparación con el inhibidor Donepezilo empleado como control en la prueba, ya que presentó una inhibición del 50% a una concentración de 0.00315 μ g/mL. (8,3 nM)

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de los extractos frente al sistema acetilcolinesterasa.

Código	Género/Especie	% Inh $\pm$ eem[†]
EM -562	<i>Laetiporus cf sulphureus</i>	37,53 $\pm$ 0,73
EM-773	<i>Pholiota sp.</i>	44,59 $\pm$ 0,83
EM-774	<i>Ganoderma cf amazonense</i>	41,87 $\pm$ 1,15
EM-775	<i>Stereum sp.</i>	28,10 $\pm$ 0,62
EM-777	<i>Oudemansiella platensis</i>	24,23 $\pm$ 1,04
EM-778	<i>Laetiporus sp.</i>	29,99 $\pm$ 0,55
EM-779	<i>Omphalina sp.</i>	33,98 $\pm$ 0,76
EM-780	<i>Pleurotus ostreatus</i>	34,84 $\pm$ 0,74
EM-781	<i>Macrolepiota procera</i>	30,62 $\pm$ 1,07
EM-782	<i>Galerina sp.</i>	22,59 $\pm$ 0,41
EM-783	<i>Gerronema sp.</i>	35,99 $\pm$ 1,41
EM-785	<i>Laetiporus sp.</i>	34,06 $\pm$ 0,89
EM-787	<i>Trametes sp.</i>	40,55 $\pm$ 1,27
EM-792	<i>Trametes versicolor</i>	27,32 $\pm$ 0,31
EM-794	<i>Trichaptum sp.</i>	43,53 $\pm$ 0,60
EM-797	<i>Trogia cf. Brevipes</i>	28,09 $\pm$ 0,69
EM-800	<i>Lentinus crinitus</i>	42,71 $\pm$ 1,21
EM-801	<i>Schizophyllum comune</i>	32,71 $\pm$ 1,40
EM-802	<i>Stereum cf. Hirsutum</i>	36,62 $\pm$ 1,50
EM-803	<i>Cf. Entoloma</i>	33,84 $\pm$ 1,02

† Los datos representan el promedio de tres determinaciones y tres réplicas, y su error estándar de la media n=9.

Fuente: La Autora.

Elaboración: La Autora.

De las setas, se han aislado componentes activos de los que destacan los terpenos, siendo básicamente un grupo de hidrocarburos no saturados y saturados responsables de diversas actividades farmacológicas como: antiparasitarios, anticolinesterásicos, antivirales, antibacterianos y anti-inflamatorios. De este grupo, el compuesto más estudiado es el lanostano, un triterpenoide con actividad anti-acetilcolinesterasa encontrado en la especie *Ganoderma lucidum*. Por lo tanto, el uso de triterpenoides en el desarrollo de medicamentos, abrió una forma más de utilizarlos como un posible fármaco para el tratamiento del Alzheimer y las enfermedades neurodegenerativas (Rathore, Prasad, & Sharma, 2017).

Se han identificado al menos 140 triterpenos diferentes en *Ganoderma lucidum* de los que incluyen: ganoderic, lucidenic, ganodermic, ácidos ganoderénicos, ganolúcidos y applanoxídicos, lucidones, ganoderals y ganoderols. Estos compuestos poseen la capacidad para eliminar los radicales libres, lo que puede suprimir el daño de oxígeno reactivo que conlleva a la patología de enfermedad de Alzheimer (Phan et al., 2015).

En un estudio realizado en Malasia, para aprovechar el conocimiento indígena en la utilización de la diversidad fúngica como alimento y medicina, se analizaron tres hongos por sus capacidades para mantener y reconstruir la red de comunicaciones neuronales: *Ganoderma neo-japonicum*, *Pleurotus giganteus*, y *Lignosus rhinocerus*, en donde se demostró experimentalmente que los extractos acuosos obtenidos, inducen la aparición de neuritas del 73%, 31.7 % y 24,4% - 42,1%, respectivamente, en células de feocromocitoma de rata (PC12Adh). Se propuso que *G. neo-japonicum* contenía compuestos bioactivos de tipo factor de crecimiento nervioso (FCN) por lo que se contempla que los hongos pueden ser candidatos para el desarrollo de alimentos para reducir o prevenir la gravedad de la neurodegeneración relacionada con la edad y enfermedades neurodegenerativas (Sabaratnam, Kah-Hui, Naidu, & David, 2013).

Además, actividades inhibitoras de AChE y butirilcolinesterasa de extractos de especies de *Tricholoma* (*T. fracticum*, *T. imbricatum*, y *T. terreum*) fueron probados; como resultado, solo el extracto de hexano confirmó que *T. imbricatum* (0.2 mg / mL) era capaz de inhibir AChE y butyrylcolinesterasa en $71.8 \pm 0.3\%$ y $52.6 \pm 1.0\%$, respectivamente (Phan et al., 2015).

En este trabajo, se ha destacado los hongos Basidiomicetos que tienen efectos beneficiosos en la salud neuronal y aquellos que poseen actividad como antihipoglucemiantes haciendo énfasis en los extractos crudos. Tomados en conjunto, estos hongos demuestran la variedad fúngica del filo Basidyomicota de la provincia de Loja.

CONCLUSIONES

Todos los hongos encontrados en este estudio, pertenecen a la división Basidiomycota, siendo predominantes y comunes los que corresponden al orden Agaricales (10 hongos), seguido de los órdenes Polyporales (7 hongos), Russulales (2), e Hymenochaetales (1).

De los 20 especímenes de hongos, se obtuvieron rendimientos variables con el método de extracción empleado, los cuales van desde 2,06% (*Ganoderma* cf. *Amazonense*) hasta 46,68 % (*Galerina* sp.) que dependen principalmente de la composición de cada especie.

A pesar de que ninguno de los 20 especímenes evaluados presento actividad anticolinérgica, se destacan los especímenes *Laetiporus* cf. *Sulphureus* (EM-562) y *Gerronema* sp. (EM-783) por su capacidad inhibitoria fuerte ($CI_{50} < 100$) en los sistemas de alfa- glucosidasa y alfa- amilasa, pudiendo ser candidatos para una futura investigación por su posible efecto hipoglucemiante.

RECOMENDACIONES

Debido a la poca cantidad de material fúngico colectado de los especímenes, *Laetiporus* cf. *Sulphureus* (EM-562) y *Gerronema* sp. (EM-783); y en virtud de su significativa capacidad hipoglucemiante, sería conveniente evaluar la posibilidad del cultivo in vitro y valorar nuevamente su actividad.

Ampliar la zona de recolección para coleccionar e identificar una mayor cantidad de especímenes para valorar su potencial farmacológico y contribuir al conocimiento de la diversidad fúngica en las regiones del sur del Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, N., Ismail, S. M., Aminudin, N., Shuib, A. S., & Lau, B. F. (2012). Evaluation of Selected Culinary-Medicinal Mushrooms for Antioxidant and ACE Inhibitory Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2012, 464238. <https://doi.org/10.1155/2012/464238>
- Ahmadjian, V., Alexopoulos, C. J., & Moore, D. (2018). fungus | Definition, Characteristics, Types, & Facts - Annotated classification | Britannica.com. Retrieved April 8, 2018, from <https://www.britannica.com/science/fungus/Annotated-classification#ref993767>
- 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. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 36: 193-201.
- Barragán Torres, V. A., García Prada, L. M., Mateus Dueñez, L. M., Mateus Mateus, L. C., Sanabria, F. R., Barragán Torres, V. A., ... Rodríguez Sanabria, F. (2017). Aceites esenciales, obesidad y diabetes tipo 2. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(3), 289–302. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n3.69459>
- Bhagavan, N. V., & Ha, C.-E. (2011). Enzymes and Enzyme Regulation. In *Essentials of Medical Biochemistry* (pp. 47–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-095461-2.00006-0>
- Blackwell, M., Rytas, V., Timothy Y, J., & Taylor, J. W. (2012). Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.. Retrieved April 8, 2018, from <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30>
- Boonsong, S., Klaypradit, W., & Wilaipun, P. (2016). Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources*, 50(2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/J.ANRES.2015.07.002>
- Capparelli, A., & Lodeiro, A. (2016). *Catálisis enzimática: fundamentos químicos de la vida* (1st ed.). Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/59590/Documento_completo_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1#page=97
- Carretero, M. (2003). *Offarm*. Offarm. Doyma. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-inhibidores-acetilcolinesterasa-el-tratamiento-13050017>
- Castillo, T., & Noriega, V. (2012). *MONOGRAFÍA DEL CANTÓN SARAGURO DE LA PROVINCIA DE LOJA*. Retrieved from <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/2532/3/Tesis de Tania Castillo Orellana.pdf>
- Cenci, R., Cocchi, L., Petrini, O., & European Commission. Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability. (2011). *Chemical elements in ascomycetes and basidiomycetes the reference mushrooms as instruments for investigating bioindication and biodiversity*. Publications Office. Retrieved from

<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/chemical-elements-ascomycetes-and-basidiomycetes-reference-mushrooms-instruments>

- Chapa, J. (2018). Neuroimagen en Enfermedades Neurodegenerativas | Medicina y Salud Pública. Retrieved August 8, 2018, from <http://www.medicinaysaludpublica.com/neuroimagen-en-enfermedades-neurodegenerativas/>
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Biología*. (Médica Panamericana, Ed.) (7th ed.). Chile. Retrieved from <http://www.curtisbiologia.com/node/305>
- De Silva, D. D., Rapior, S., Hyde, K. D., & Bahkali, A. H. (2012). Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity*, 56(1), 1–29. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0187-4>
- Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2013). *Diabetes Care*, 36, 567–574. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>
- Díaz Cruz, B. (2015). *Composición química y antioxidantes en setas comestibles*. Universidad de Valladolid. Retrieved from <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/14239>
- Fatmawati, S., Shimizu, K., & Kondo, R. (2011). Ganoderol B: A potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Phytomedicine*, 18(12), 1053–1055. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.011>
- File:Competitive&NonCompetitive Enzyme Inhibition.jpg - Wikimedia Commons. (2016). Retrieved April 16, 2018, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Competitive%26NonCompetitive_Enzyme_Inhibition.jpg
- Gallejo Arjona, E. (2016). Los hongos y el paso del tiempo. *Eubacteria*, 36, 25–31. Retrieved from http://www.um.es/eubacteria/Los_hongos_y_el_paso_del_tiempo.pdf
- Gualán, J., & Vallejo, M. (2015). “LAS PLANTAS DE USO RITUAL Y SU EFECTO EN LA SANACIÓN DE LAS PERSONAS EN EL BARRIO ILINCHO DEL CANTON SARAGURO.” Universidad Nacional de Loja. Retrieved from http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/13487/1/Tesis_Planta_de_Uso_Ritual.pdf
- Hanh, H., Tran, T., Chau Nguyen, M., Le, H. T., Nguyen, T. L., Pham, T. B., ... Nguyen, T. D. (2014). Inhibitors of α -glucosidase and α -amylase from *Cyperus rotundus*. *Pezzuto Pharm Biol*, 52(1), 74–77. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.814692>
- Howes, M.-J. R., Fang, R., & Houghton, P. J. (2017). Effect of Chinese Herbal Medicine on Alzheimer's Disease (pp. 29–56). <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.02.003>
- Im, K., Nguyen, T., Choi, J., & Lee, T. (2016). In Vitro Antioxidant, Anti-Diabetes, Anti-Dementia, and Inflammation Inhibitory Effect of *Trametes pubescens* Fruiting Body Extracts. *Molecules*, 21(5), 639. <https://doi.org/10.3390/molecules21050639>
- Kim, D. . Y., Bae, S.-M., & Lee, J.-S. (2014). Physiological Activities of Water Extract and

- Solvent Fractions of an Edible Mushroom, *Pholiota adiposa*. *The Korean Journal of Mycology*, 42(3), 207–212. <https://doi.org/10.4489/KJM.2014.42.3.207>
- Nagy, L. G., & Szöllősi, G. (2017). Fungal Phylogeny in the Age of Genomics: Insights Into Phylogenetic Inference From Genome-Scale Datasets (pp. 49–72). <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.008>
- OMS. (2016). INFORME MUNDIAL SOBRE LA DIABETES. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf;jsessionid=8F4665E8DEC34B4A46F406ED84AEE51A?sequence=1
- OMS. (2017). Demencia. Retrieved August 8, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- OMS | Diabetes. (2017). WHO.
- OMS | Medicina tradicional: definiciones. (2010). WHO. Retrieved from http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- Patočka, J. (2012). NATURAL CHOLINESTERASE INHIBITORS FROM MUSHROOMS. *Military Medical Science Letters*, 81(1), 40–44. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2012.005>
- Pérez Daniels, P. (2015). Conferencia Hongos de Ecuador. Retrieved August 29, 2018, from <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias275.html>
- Phan, C.-W., David, P., Naidu, M., Wong, K.-H., & Sabaratnam, V. (2015). Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3), 355–368. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.887649>
- Quizhpe, W., Veintimilla, D., Aguirre, Z., Jaramillo, N., Pacheco, E., Vanegas, R., & Jadán, O. (2017). Unidades de paisaje y comunidades vegetales en el área de Inkapirca, Saraguro – Loja, Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 7(1). Retrieved from <http://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/175/171>
- Rahman, M. A., Abdullah, N., & Aminudin, N. (2016). Interpretation of mushroom as a common therapeutic agent for Alzheimer's disease and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1131–1142. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1100585>
- Rai, M., Tidke, G., & Wasser, S. P. (2004). Therapeutic Potential of Mushrooms. *Natural Product Radiance*, 246–257. Retrieved from http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/8102/1/NPR_4%284%29_246-257.pdf
- Rathore, H., Prasad, S., & Sharma, S. (2017). Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition*, 5(2), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2017.02.001>
- Rice University. (2013). *Enzymes - Biology - OpenStax CNX*. Houston, Texas.
- Ríos, M. del P., Hoyos, J. L., & Mosquera, S. A. (2010). *Biotecnología en el sector*

agropecuario y agroindustrial. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* (Vol. 8). Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612010000200012&script=sci_abstract&tlng=es

- S., W. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Sabaratnam, V., Kah-Hui, W., Naidu, M., & David, P. R. (2013). Neuronal Health – Can Culinary and Medicinal Mushrooms Help? *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(1), 62–68. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.106549>
- Samara Rodríguez-Rivera, N., Cuautle-Rodríguez, P., & Molina-Guarneros, J. A. (2017). www.medigraphic.org.mx Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Revista Hospital Juarez*, 203–2011. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2017/ju174e.pdf>
- Segura, T., Galindo, M. F., Rallo-Gutiérrez, B., Ceña, V., & Jordán, J. (2003). [Pharmacological targets in neurodegenerative diseases]. *Revista de Neurología*, 36(11), 1047–1057. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808502>
- Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O., & Singh, D. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 165–188. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.050>
- Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014). α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166–175. <https://doi.org/10.12691/JAEM-2-4-10>
- Swann, E., & Hibbett, D. S. (2007). Basidiomycota. The Club Fungi. Retrieved April 8, 2018, from <http://www.tolweb.org/Basidiomycota/20520>
- The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2017). Basidiomycota. Phylum of fungi. Retrieved April 8, 2018, from <https://www.britannica.com/science/Basidiomycota>
- Torres-Naranjo, M., Suárez, A., Gilardoni, G., Cartuche, L., Flores, P., & Morocho, V. (2016). Chemical Constituents of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and Its In Vitro α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activities. *Molecules*, 21(11), 1461. <https://doi.org/10.3390/molecules21111461>
- Vadivel, V., Patel, A., & Biesalski, H. K. (2012). Effect of traditional processing methods on the antioxidant, α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition properties of *Sesbania sesban* Merrill seeds. *CyTA - Journal of Food*, 10(2), 128–136. <https://doi.org/10.1080/19476337.2011.601427>
- Wahbeh, G. T., & Christie, D. L. (2011). Basic Aspects of Digestion and Absorption. *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*, 10–19.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0774-8.10002-8>
- Wasser, S. P. (2017). Medicinal Properties and Clinical Effects of Medicinal Mushrooms. In *Edible and Medicinal Mushrooms* (pp. 503–540). Chichester, UK: John Wiley & Sons,

Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch22>

Zhang, R., Xu, S., Cai, Y., Zhou, M., Zuo, X., & Chan, P. (2011). Ganoderma lucidum Protects Dopaminergic Neuron Degeneration through Inhibition of Microglial Activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2011, 156810. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep075>

ANEXOS

ANEXO 1. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA ALFA – GLUCOSIDASA

Reactivos ensayo α – glucosidasa.	Blanco	Prueba (As)	ACT_ENZ (Ao)	Control Positivo [†]
Inhibidor (Acarbosa)[†]	-	-	-	20
Disolvente[‡]/ Extracto	5(Disol)	5(Extract)	5(Disol)	-
PBS 7.4 pH	95	75	75	60
Enzima 15 μg/mL (150 mU/mL)	-	20	20	20
Preincubación	37°C			
<i>p</i>-NPG 5mM	20	20	20	20
Incubación 60 min a 37°C				
Leer a 405nm (60mins)	c/5mins			

[†]Como control positivo se utilizó Acarbosa a una concentración de 5mg/mL.

[‡]Se realizó dos fracciones y se utilizó como disolvente agua (H₂O) y metanol (MeOH). Concentración del extracto 10 mg/ 208 μ L.

Fuente: Departamento de Química – Sección Bioensayos.

ANEXO 2. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA ALFA -AMILASA

REACTIVOS ENSAYO α -AMILASA	Blanco (μ L)	Prueba (ABS1)	Blanco Control Extracto (ABS2)	Act. Enz. (ABS3)	Control Almidón (ABS4)	Control Positivo Acarbose
PBS	55	35	55	35	55	20
Inhibidor [†]	-	-	-	-	-	20
Extracto [‡] / MeOH	5 (MeOH)	5**	5**	5 (MeOH)	5 (MeOH)	-
ENZIMA (50 μ g/mL)	20	20	-	20	-	20
SUSTRATO (Almidón 1%)	-	20	20	20	20	20
Incubación (mins)	-	10 min	10 min	10 min	10min	10min
STOP REACTION (0,1M)	50	50	50	50	50	50
SOL.YODO (1mM)	150	150	150	150	150	150
Lectura 580 nm						

[†]El inhibidor o control positivo empleado para esta prueba es la Acarbose con una concentración de 5mg/ml.

[‡]Concentración del extracto: 10 mg/208 μ l MeOH.

El contenido de los reactivos y soluciones están expresados en microlitros (μ l).

Fuente: Departamento de Química – Sección Bioensayos.

ANEXO 3. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA ACETILCOLINESTERASA

Reactivos	BLANCO	ACT_ENZ (Ao)	Control Donepezilo	Prueba (As)
Buffer A – TRIS pH 8	80	40	58	40
ACETILCOLINA (15 mM)	-	20	20	20
MeOH:H2O/EXTRACTO [‡]	20	20	-	20
DONEPEZILO [†] (inhibidor)	-	-	2	-
DTNB (3 Mm) Tris 50 mM pH 8	100	100	100	100
INCUBACIÓN 25°C, (Lectura 402 nm)	3 mins	3 mins	3 mins	3 mins
AChE (0,5 U/mL)(BUFFER A-TRIS-50Mm pH8)	-	20	20	20
Lectura a 412 nM. Tiempo 15 min con intervalo de tiempo de 60 segundos.	15min	15min	15min	15min

[‡]Concentración del extracto: 10 mg/208 µl MeOH.

[†]El inhibidor o control positivo empleado para esta prueba es Donepezilo con una concentración de 10 µM.
Las cantidades de reactivos y soluciones están expresados en µL.

Fuente: Departamento de Química.

ANEXO 4. HONGOS RECOLECTADOS EN CERRO ACACANA, PARROQUIA SAN LUCAS Y EN INKAPIRCA, CANTÓN SARAGURO.



Figura 6. *Omphalina* sp. (EM -779)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 7. *Macrolepiota procera* (EM -781)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 8. *Oudemansiella platensis* (EM -777)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 9. *Stereum* sp. (EM -775)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 10. *Trogia brevipes* (EM -797)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 11. *Trichamptum* sp. (EM -794)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 12. *Stereum* cf. *Hirsutum* (EM -802)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 13. *Lentinus crenitus* (EM -800)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 14. *Ganoderma amazonense* (EM-774)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 15. *Gerronema* sp. (EM -783)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 16. *Laetiporus* sp. (EM 785)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora



Figura 17. *Galerina* sp. (EM -782)

Fuente: La Autora

Elaboración: La Autora