



# UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

---

---

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

TESIS

*Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de  
Ganoderma lucidum de origen nacional y chino.*

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**QUÍMICA GUADALUPE BELBERIA ESPINOSA MÉNDEZ**

**Director**

Dra. Verónica Rodríguez

Soria

**Codirector**

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

**Asesores**

Dra. Lydia María Pérez Díaz

Dra. Laura Contreras Mioni

Dr. Daniel Nava López

Puebla, Pue.

Noviembre 2022



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado De Puebla

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Se aprueba la tesis:

*“Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de Ganoderma lucidum de origen nacional y chino”*

Autor:

Guadalupe Belberia Espinosa Méndez

Comité de revisión:

---

Dra. Verónica Rodríguez Soria  
Director

---

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz  
Codirector

---

Dra. Laura Contreras Mioni  
Asesor interno

---

Dra. Lydia María Pérez Díaz  
Asesor externo

---

Dr. Daniel Nava López

**Resumen: Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino.**

**Introducción.** Este trabajo de investigación evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino, los extractos acuosos y metanólicos fueron probados como una alternativa para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias patógenas de importancia clínica tanto Gram positivas como Gram negativas, las cepas utilizadas fueron *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* cada una de ellas siendo ATCC y de aislamiento clínico, estas últimas principalmente debido a la resistencia bacteriana que se ha observado. También se realizó la maceración y extracción del hongo chino con tequila y mezcal para identificar posibles metabolitos bioactivos presentes en estos disolventes.

Existe una gran cantidad de hongos medicinales distribuidos alrededor del mundo, los cuales se caracterizan por sus efectos terapéuticos y han sido utilizados como coadyuvantes para el tratamiento de diversas enfermedades. *Ganoderma lucidum* es un hongo ancestral utilizado en la medicina tradicional china debido a que produce más de 400 compuestos bioactivos entre los que destacan los polisacáridos y triterpenos, estos últimos se caracterizan por sus propiedades antimicrobianas, (Gao et al., 2003) por lo que este hongo ha sido producido y comercializado en diferentes lugares para su uso. Según lo reportado en las investigaciones científicas (Hennicke et al., 2016) y (Keypour et al., 2010) mencionan que las características del hongo cambian dependiendo de las condiciones en las que se cultive como son la humedad, temperatura, intensidad de luz, tipo de sustrato, etc. por lo que el efecto terapéutico también se verá afectado. El hongo de origen nacional que se analizó fue producido en la ciudad de Puebla, se consideró importante ya que impacta directamente en el desarrollo de la producción pues proporciona información de manera segura en el consumo del extracto, así como también el apoyo hacia los agricultores de la región.

La metodología que se empleó se dividió en 3 etapas. La primera etapa consistió en las extracciones y purificación, para la maceración tanto del hongo nacional y chino, se utilizó como disolvente el diclorometano y metanol ya que de acuerdo a la bibliografía reportada por varios autores como (Meneses et al., 2016) se ha demostrado que estos solventes presentan mejor extracción de los metabolitos, posteriormente en las purificaciones en cromatografía de placa fina se utilizaron sistemas de diferentes mezclas de disolventes como hexano y acetato de etilo según

el extracto.

La segunda etapa consto de las pruebas fitoquímicas en donde se identificó la presencia de metabolitos bioactivos mayoritarios , en el extracto nacional con diclorometano y metanol se encontraron alcaloides, glucósidos y triterpenos, en el extracto chino con diclorometano se detectaron alcaloides, flavonoides y glucósidos, y por último en el extracto chino con metanol hubo únicamente presencia de flavonoides. La técnica de espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier corrobora la presencia de un glucósido cardiotónico y un flavonoide para los extractos metanólicos del hongo nacional y chino respectivamente .

En la tercera etapa se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos, diclorometánicos y acuosos, para ello se emplearon dos técnicas, la primera: la técnica de Kirby Bauer, de acuerdo a esta técnica los halos aproximadamente entre 30-35 mm son aquellos que presentan sensibilidad y los inferiores a 15 mm son resistentes, posteriormente con la técnica de microdilución se buscó obtener la concentración mínima inhibitoria para inhibir el 50% de la carga bacteriana, las cepas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* todas de aislamiento clínico y ATCC en concentraciones de 0.448 µg/µL, 4.48 µg/µL, 44.8 µg/µL y 448 µg/µL cada una, de las cuales no se observó una consistencia en cuanto al aumento de concentración del extracto ya que en algunos casos con menor concentración presento mejor inhibición a la cepa.

**Planteamiento del problema.** En México no se cuenta con un estudio químico en el que se realice la comparación entre las diferentes cepas para detectar las moléculas bioactivas que se producen por lo diferentes medios de cultivo del hongo *Ganoderma lucidum*. La multiresistencia de las bacterias y el auge por el uso de la medicina tradicional ha servido como una alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos, por lo que la presente investigación tiene como finalidad identificar estas diferencias y evaluar la actividad antimicrobiana que producen los extractos de *Ganoderma lucidum*.

El 30% de los fármacos fueron desarrollados a partir del estudio de las plantas, por lo que la comercialización de los extractos a partir de las plantas medicinales ayudaría a rescatar la labor de los productores, así como continuar con la integración del uso de los hongos como una alternativa sustentable y natural para el tratamiento de algunas de las enfermedades más comunes como lo son las infecciones causadas por microorganismos.

**Objetivo.** Evaluar las moléculas bioactivas de los hongos de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino mediante técnicas microbiológicas para conocer el efecto antimicrobiano que producen los extractos.

**Metodología.** Se hizo una revisión en la literatura de los hallazgos encontrados del hongo de *Ganoderma lucidum* utilizando las palabras clave en las bases de datos de acceso libre como PubMed, Google Scholar y la biblioteca digital de UPAEP.

Mediante pruebas fitoquímicas y espectroscopia de infrarrojo se analizaron las diferencias químicas basados en la composición de los metabolitos secundarios producidos entre los hongos de origen nacional y chino. La técnica de extracción por arrastre de vapor de agua nos permitió obtener los extractos acuoso, metanólico y con diclorometano de los cuales al emplear técnicas microbiológicas como Kirby Bauer se determinaron los efectos antimicrobianos y con la técnica de microdilución se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno.

**Resultados.** Las pruebas fitoquímicas dieron positivo para alcaloides, flavonoides y glucósidos con el extracto del hongo chino con diclorometano y positivo a flavonoides para el extracto chino con metanol, los extractos del hongo nacional con diclorometano y metanol dieron positivo a la presencia de alcaloides, glucósidos y triterpenos.

Se analizaron los espectros infrarrojos de los extractos metanólicos del hongo nacional y chino encontrando presencia de glucósidos y flavonoides de acuerdo con lo reportado en la bibliografía. Para las pruebas microbiológicas la técnica de Kirby Bauer no presentaron halos de inhibición en las dos cepas de *Candida albicans* de aislamiento clínico 68244 y ATCC 60193 del extracto con diclorometano y metanol, sin embargo si se detectó presencia de halos de inhibición aproximadamente de 30 mm para las cepas de *Staphylococcus aureus* de aislamiento clínico 68110F y ATCC 29213 y *Escherichia coli* de aislamiento clínico 0682380 y ATCC 25922 en los extractos metanólico y con diclorometano del hongo nacional y chino. En la prueba de microdilución se detectó que la concentración del extracto puede servir como fuente de carbono o como inhibidor del crecimiento microbiano.

#### **Conclusiones.**

Se observan diferencias en la presencia de metabolitos secundarios entre los metabolitos del

hongo de *Ganoderma lucidum* nacional y chino en las pruebas fitoquímicas.

En los espectros IR se identificaron bandas representativas de los grupos funcionales que forman parte de las estructuras base de glucósidos y flavonoides a las que dieron positivas las pruebas fitoquímicas.

En la extracción del hongo de *Ganoderma lucidum* chino en mezcal se observó presencia de metabolitos bioactivos como alcaloides y bandas representativas de estos grupos funcionales en los espectros IR.

Se observa actividad antimicrobiana en las cepas de los extractos metanólicos como *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a una concentración de 4.48 µg/µL y *Candida albicans* de aislamiento clínico 682444 con concentración de 0.448 µg/µL, en el extracto acuoso se observó inhibición a una concentración de 448 µg/µL en las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* de aislamiento clínico 0682380 y *Candida albicans* ATCC 60193, para *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración de 4.48 µg/µL y *Candida albicans* de aislamiento clínico 682444 a una concentración de 44.8 µg/µL, sin embargo, la concentración de los extractos influirá directamente para que actúe como fuente de carbono o como inhibidor.

**Palabras clave.**

*Ganoderma lucidum*, moléculas bioactivas, pruebas fitoquímicas, infrarrojo, Kirby Bauer, microdilución.

## **Summary: Evaluation of the antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extracts of national and chinese origin**

**Introduction.** This research work evaluated the antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extracts of national and chinese origin, the aqueous and methanolic extracts were tested as an alternative to inhibit the growth of fungal and pathogenic bacteria of clinical importance, both Gram positive and Gram negative, the strains used were *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, each of them being ATCC and clinical isolation, the latter mainly due to the bacterial resistance that has been observed. The maceration and extraction of the chinese fungus with tequila and mezcal was also carried out to identify possible bioactive metabolites present in these solvents.

There is a large number of medicinal mushrooms distributed around the world, which are characterized by their therapeutic effects and have been used as adjuvants for the treatment of various diseases. *Ganoderma lucidum* is an ancient fungus used in traditional chinese medicine because it produces more than 400 bioactive compounds, among which polysaccharides and triterpenes stand out, the latter being characterized by their antimicrobial properties (Gao et al., 2003). this fungus has been produced and marketed in different places for its use. As reported in scientific research (Hennicke et al., 2016) and (Keypour et al., 2010) said the characteristics of the fungus change depending on the conditions in which it is grown, such as humidity, temperature, light intensity, type of substrate, etc. so the therapeutic effect will also be affected. The fungus of national origin that was analyzed was produced in the city of Puebla, it was thought important since it directly impacts the development of production because it provides information in a safe way in the consumption of the extract, as well as support for farmers in the region.

The methodology used was divided into 3 stages. The first stage consisted of the extractions and purification, for the maceration of both the national and chinese fungus, dichloromethane and methanol were removed as solvent since according to the bibliography reported by several authors such as (Meneses et al., 2016) it has been showed that these solvents present a better extraction of the metabolites, later in the purifications in thin plate chromatography systems of different mixtures of solvents such as hexane and ethyl acetate were used depending on the extract.

The second stage consisted of phytochemical tests where the presence of major bioactive metabolites was identified, in the national extract with dichloromethane and methanol alkaloids,

glycosides and triterpenes were found, in the chinese extract with dichloromethane alkaloids, flavonoids and glycosides were detected, and finally, in the chinese extract with methanol, there was only the presence of flavonoids. The Fourier transform infrared spectroscopy technique corroborated the presence of a cardiogenic glycoside and a flavonoid for the methanolic extracts of the national and chinese fungus, respectively.

In the third stage, the antimicrobial activity of the methanolic, dichloromethane and aqueous extracts was evaluated, for which two techniques were used, the first: the Kirby Bauer technique, according to this technique the halos approximately between 30-35 mm are those that they present sensitivity and those less than 15 mm are resistant, later with the microdilution technique it was sought to obtain the minimum inhibitory concentration to inhibit 50% of the bacterial load, the strains used were *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* all of clinical isolation and ATCC in concentrations of 0.448  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 4.48  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 44.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and 448  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  each, of which no consistency was observed in terms of the increase in extract concentration since in some cases with less concentration presented better inhibition to the strain.

**Problem Statement.** In Mexico there is no chemical study in which the comparison between the different strains is made to detect the bioactive molecules that are produced by the different culture media of the fungus *Ganoderma lucidum*. The multi-resistance of bacteria and the rise in the use of traditional medicine has served as an alternative for the development of new drugs, so the purpose of this research is to identify these differences and evaluate the antimicrobial activity produced by *Ganoderma lucidum*.

30% of the drugs were developed from the study of plants, so the commercialization of extracts from medicinal plants would help rescue the work of producers as well as continue with the integration of the use of fungi as a sustainable and natural alternative for the treatment of some of the most common diseases such as infections caused by microorganisms.

**Objective.** Evaluate the bioactive molecules of *Ganoderma lucidum* mushrooms of national and chinese origin through microbiological techniques to determine the antimicrobial effect produced by the extracts.

**Methodology.** A literature review of the findings of the *Ganoderma lucidum* fungus was made

using keywords in open access databases such as PubMed, Google Scholar and the UPAEP digital library.

By means of phytochemical tests and infrared spectroscopy, the chemical differences based on the composition of the secondary metabolites produced between the mushrooms of national and chinese origin were analyzed. The water vapor drag extraction technique allowed us to obtain the aqueous, methanolic and dichloromethane extracts, from which the antimicrobial effects were determined using microbiological techniques such as Kirby Bauer and the minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained using the microdilution technique. ) each.

**Results.** Phytochemical tests were positive for alkaloids, flavonoids and glycosides with the extract of the chinese mushroom with dichloromethane and positive for flavonoids with the chinese extract with methanol, the extracts of the national mushroom with dichloromethane and methanol were positive for the presence of alkaloids, glycosides and triterpenes. .

The infrared spectra of the methanolic extracts of the national and chinese fungus were analyzed, finding the presence of glycosides and flavonoids in accordance with what was reported in the bibliography. For the microbiological tests, the Kirby Bauer technique did not present inhibition halos in the two *Candida albicans* strains of clinical isolation 68244 and ATCC 60193 from the extract with dichloromethane and methanol, however, the presence of inhibition halos of approximately 30 mm was detected for the strains of *Staphylococcus aureus* of clinical isolation 68110F and ATCC 29213 and *Escherichia coli* of clinical isolation 0682380 and ATCC 25922 in the methanolic and dichloromethane extracts of the national and chinese fungus.

In the microdilution test, it was detected that the concentration of the extract can serve as a carbon source or as an inhibitor of microbial growth.

**Conclusions.** Differences in the presence of secondary metabolites are observed between the national and chinese *Ganoderma lucidum* fungus metabolites in phytochemical tests.

In the IR spectra, representative bands of the functional groups that are part of the base structures of glycosides and flavonoids to which the phytochemical tests gave positive results were identified. In the extraction of the chinese *Ganoderma lucidum* fungus in mezcal, the presence of bioactive metabolites such as alkaloids and representative bands of these functional groups in the IR spectra were observed.

Antimicrobial activity is observed in the strains of the methanolic extracts such as *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 at a concentration of 4.48 µg/µL and *Candida albicans* of clinical isolation 682444 with a concentration of 0.448 µg/µL, in the aqueous extract inhibition was observed at a concentration of 448 µg/µL in strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, clinical isolate *Escherichia coli* 0682380 and *Candida albicans* ATCC 60193, for *Escherichia coli* ATCC 25922 at a concentration of 4.48 µg/µL and clinical isolate *Candida albicans* 682444 at a concentration of 44.8 µg/µL, however, the concentration of the extracts will directly influence whether it acts as a carbon source or as an inhibitor.

**Keywords.** *Ganoderma lucidum*, bioactive molecules, phytochemical tests, infrared, Kirby Bauer, microdilution.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la vida y por permitirme concluir una meta más en mi desarrollo profesional, agradezco a mis padres Abel y Lilia por haberme inculcado el deseo de superarme día a día y a luchar por mis sueños a pesar de la adversidad, por su apoyo incondicional y por estar presentes siempre para mí y para mis hermanos, a mi hija Aide por ser mi compañera de vida y la fuerza de cada día para continuar adelante, por sus risas, su enseñanza, su amor desmedido y por levantarme cada vez que me he caído, sin ti nada de esto hubiera sido posible amor, a mis hijas Guadalupe y Eliette quienes fueron las detonantes para iniciar este nuevo proyecto y quienes desde donde están me dan la esperanza de reencontrarnos algún día nuevamente. Agradezco también a mis familiares y amigos que han puesto un granito de arena para que todo esto resultara con éxito. A mi tía Güera por ser y estar en todos los aspectos que la he necesitado, por ser esa amiga que todos deseamos tener para recurrir a ella en cualquier momento, a mis abuelitos Pepé y Belberia que desde el cielo me siguen cuidando y dando su bendición, los extraño mucho. Agradezco haber encontrado en este camino a mi amiga Andrea Gordillo quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme y con quien compartí más que una relación estudiantil sino una verdadera amistad. Un agradecimiento especial a todos los docentes de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla por colaborar en mi formación académica.

Por supuesto agradezco también al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca numero 1001574 la cual fue otorgada para la realización de este posgrado y a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla por las facilidades brindadas para el desarrollo del proyecto.

Agradezco el apoyo brindado por el Centro de Servicios de Alta Tecnología (CESAT) por la realización de los espectros de FTIR.

**“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”**

**Filipenses 4:13**

## INDICE DE CONTENIDO

### CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1	Introducción.....	18
1.2	Problemática .....	19
1.3	Justificación.....	20
1.4	Objetivos.....	21
1.4.1	Objetivo general.....	21
1.4.2	Objetivos específicos .....	22
1.5	Hipótesis .....	22

### CAPITULO 2 MARCO TEÓRICO

2.1	Medicina tradicional china.....	22
2.2	Taxonomía de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	23
2.3	Metabolitos secundarios de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	24
2.4	Efectos farmacológicos.....	27
2.4.1	Antitumoral.....	28
2.4.2	Inmunomodulador.....	29
2.4.3	Antioxidantes .....	29
2.4.4	Actividad antibacteriana.....	30
2.4.5	Actividad antifúngica.....	30
2.4.6	Actividad antiviral.....	30
2.5	Métodos de extracción.....	30
2.6	Cromatografía en capa fina.....	32
2.7	Reveladores.....	33
2.8	UV-Vis.....	34
2.9	Espectroscopia infrarroja (IR).....	35
2.10	Tamizaje fitoquímico .....	35

2.10.1	Alcaloides .....	36
2.10.2	Glucósidos cardiotónicos.....	36
2.10.3	Triterpenos .....	36
2.10.4	Flavonoides.....	36
2.11	Antibiograma de discos, técnica de Kirby Bauer.....	37
2.11.1	Discos para antibiogramas.....	37
2.11.2	Cepas de control.....	38
2.11.3	Medios de cultivo.....	38

### **CAPITULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1	Diseño metodológico .....	39
3.2	Obtención e identificación de las muestras de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	41
3.3	Obtención de los extractos por maceración.....	42
3.4	Separación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina (CCF).....	43
3.5	Espectroscopia UV-Vis.....	44
3.6	Pruebas fitoquímicas .....	44
3.6.1	Alcaloides .....	45
3.6.2	Saponinas .....	46
3.6.3	Flavonoides.....	46
3.6.4	Glucósidos.....	47
3.6.5	Triterpenos .....	47
3.7	Análisis por espectroscopia de Infrarrojo.....	48
3.8	Efecto antimicrobiano de los extractos con diclorometano y metanol de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional y chino.....	48
3.9	Concentración mínima inhibitoria de los extractos acuoso y metanólico de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional... ..	49

### **CAPITULO 4 RESULTADOS Y DISCUSION**

4.1.1	Extracción y plaqueo en cromatografía de capa fina de <i>Ganoderma lucidum</i> chino.....	50
-------	---	----

4.1.2	Extracción y plaqueo en cromatografía de capa fina de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional... 52
4.1.3	Extracción de <i>Ganoderma lucidum</i> chino en tequila y mezcal.....55
4.1.4	Pruebas fitoquímicas ..... 56
4.1.5	Espectros infrarrojo..... 60
4.1.6	Pruebas de Kirby Bauer.....62
4.1.7	Pruebas de microdilución .....64
4.2	Discusión .....69
	CONCLUSIONES ..... 74
	BIBLIOGRAFÍA ..... 76

## INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Metabolitos y efectos terapéuticos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	27
Tabla 2.2 Reveladores usados en la CCD para identificar flavonoides.....	33
Tabla 2.3 Agrupamientos funcionales por intervalos de frecuencia.....	35
Tabla 4.1 Resultado de las pruebas fitoquímicas de los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> chino y nacional .....	57
Tabla 4.2 Metaanálisis.....	59
Tabla 4.3 Efecto antimicrobiano de los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> chino y nacional sobre <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>E. coli</i> .....	62
Tabla 4.4 Efecto antimicrobiano del extracto metanólico de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional sobre <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	64
Tabla 4.5 Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional sobre <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	67

## INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura tipo polisacárido de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	25
Figura 2.2 Estructuras químicas del ácido ganodérico T, D y ganoderiol F del Lingzy.....	26
Figura 3.1 <i>Ganoderma lucidum</i> chino .....	41
Figura 3.2 <i>Ganoderma lucidum</i> nacional .....	42
Figura 3.3 Equipo de rotavapor .....	43
Figura 3.4 Reacción de precipitación con reactivo de Mayer.....	45
Figura 3.5 Reacción química de la prueba de Shinoda.....	46
Figura 3.6 Reacción de Baljet.....	47
Figura 3.7 Distribución de los discos en el medio de cultivo.....	49

Figura 4.1 Análisis por cromatografía de capa fina de <i>Ganoderma lucidum</i> chino.....	50
Figura 4.2 Separación de metabolitos secundarios del extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> chino con diclorometano.....	51
Figura 4.3 Separación de metabolitos secundarios del extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> chino con metanol.....	52
Figura 4.4 Análisis por cromatografía de capa fina de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional.....	53
Figura 4.5 Análisis por cromatografía de capa fina de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional.....	53
Figura 4.6 Separación de metabolitos secundarios del extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional con diclorometano.....	54
Figura 4.7 Separación de metabolitos secundarios del extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional con metanol.....	54
Figura 4.8 Análisis por cromatografía de capa fina de <i>Ganoderma lucidum</i> chino con tequila y mezcal.....	55
Figura 4.9 Análisis por cromatografía de capa fina de <i>Ganoderma lucidum</i> chino con tequila y mezcal.....	56
Figura 4.10 Prueba positiva para alcaloides.....	58
Figura 4.11 Prueba positiva para flavonoides.....	58
Figura 4.12 Prueba positiva para glucósidos.....	58
Figura 4.13 Prueba positiva para triterpenos.....	59
Figura 4.14 Extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional con metanol.....	60
Figura 4.15 Extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> chino con metanol.....	60
Figura 4.16 Extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional con metanol, diclorometano y agua.....	61
Figura 4.17 Extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> chino con metanol, diclorometano y agua.....	61
Figura 4.18 Extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> chino con mezcal y tequila.....	62
Figura 4.19 Antibiograma de <i>Candida albicans</i> ATCC 60193 y <i>Candida albicans</i> 682444.....	63

Figura 4.20 Antibiograma de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 y <i>Staphylococcus aureus</i> 68110F.....	63
Figura 4.21 Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Escherichia coli</i> 0682380 .....	64
Figura 4.22 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto metanólico de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional a las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> de aislamiento clínico y ATCC.....	65
Figura 4.23 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto metanólico de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional a las cepas <i>Escherichia coli</i> de aislamiento clínico y ATCC.....	66
Figura 4.24 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto metanólico de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional a las cepas <i>Candida albicans</i> de aislamiento clínico y ATCC.....	66
Figura 4.25 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto acuoso de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional a las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> de aislamiento clínico y ATCC.....	67
Figura 4.26 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto acuoso de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional a las cepas <i>Escherichia coli</i> de aislamiento clínico y ATCC.....	68
Figura 4.27 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto acuoso de <i>Ganoderma lucidum</i> nacional a las cepas <i>Candida albicans</i> de aislamiento clínico y ATCC.....	68

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Introducción

La medicina tradicional china ha sido utilizada por miles de años como coadyuvante para el tratamiento de múltiples enfermedades incluyendo las hierbas medicinales como suplemento alimenticio. Los hongos se caracterizan por su diversidad en la producción de moléculas bioactivas, y en especial *Ganoderma lucidum* ha destacado por poseer propiedades medicinales, las cuales han sido reportadas en la investigación científica, sin embargo, las condiciones de producción o cultivo de estos hongos marcará una diferencia significativa en cuanto a sus moléculas bioactivas por lo que la aplicación medica será definida por esta causa.

En México no se cuenta con suficientes estudios acerca de las diferencias estructurales en la síntesis de metabolitos secundarios producidas por los medios de cultivo de las cepas del hongo de *Ganoderma lucidum* por lo que en este trabajo se investigaron dichas diferencias entre los hongos de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino.

Se realizaron los extractos metanólicos y con diclorometano de dos muestras del hongo *Ganoderma lucidum* una proveniente de China y otra cultivada en Puebla, México, se buscó el sistema adecuado para la purificación de estos extractos. Mediante pruebas fitoquímicas se identificaron los metabolitos secundarios y finalmente los espectros infrarrojos (TF-IR) nos permitieron identificar los grupos funcionales para determinar si existen diferencias estructurales en la producción de metabolitos secundarios de cada uno debido al lugar de procedencia.

## 1.2 Problemática

Hoy en día los hongos se han investigado cada vez más ya que se ha demostrado que son una valiosa fuente de nutrientes y poseen una gran cantidad de metabolitos secundarios. *Ganoderma lucidum* (también llamado Lingzhi en China y Reishi en Japón) se ha usado en la medicina tradicional china para mejorar la salud, se puede encontrar en el comercio en diferentes presentaciones ya sea como champiñones crudos, té, polvo, extractos o en capsulas (Bao et al., 2002). Pertenece al género *Ganodermateceae* y este a su vez incluye diferentes especies por lo que la mayoría han sido conocidas por sus propiedades medicinales. El *Ganoderma* descompone la madera y vive como parásito o saprófito en el tronco ya sea vivo o seco de árboles, en su mayoría de bosques templados.

El hongo de *Ganoderma lucidum* que se encuentra en la Farmacopea Herbal Americana y en la Farmacopea China posee diversos compuestos bioactivos, los cuales a través de la investigación se ha reportado que son eficientes en el tratamiento de diversas enfermedades como lo son: cáncer, diabetes, hipertensión, dislipidemias etc. (Sohretoglu & Huang, 2018) solo por nombrar de las más importantes. A pesar de todos los beneficios ya reportados de *Ganoderma lucidum*, las investigaciones fitoquímicas se han encaminado en su mayoría en China, Corea, Japón y Estados Unidos (Paterson, 2006). Recientemente también se han reportado estudios de *Ganoderma lucidum* proveniente de Europa e India (Joseph et al., 2009) (Saltarelli et al., 2009). Debido a las diferentes distribuciones geográficas, las condiciones de crecimiento y los sustratos utilizados en la producción de *Ganoderma lucidum* podemos inferir que esto afecta directamente a las propiedades del hongo y podrá aplicarse en diferentes tratamientos por los compuestos químicos encontrados en él (Keypour et al., 2010).

En México no se cuenta con un estudio en el que se realice la comparación entre las moléculas bioactivas que se producen por los diferentes medios de cultivo para producir este hongo.

Por lo cual se desarrollan las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Existen diferencias estructurales entre las moléculas bioactivas de los hongos de *Ganoderma lucidum* de producción mexicana y china?
2. ¿Los extractos de tequila y mezcla extraen la mayor cantidad de metabolitos bioactivos de *Ganoderma lucidum*?

### **1.3 Justificación**

El término “hongo” ha sido utilizado para nombrar aquellos que producen cuerpos fructíferos macroscópicos, se creía que existían alrededor de 1.5 millones, pero este número ha aumentado significativamente con el paso del tiempo llegando a rondar entre los 2.2 a 3.8 millones alrededor de todo el mundo, sin embargo, conocer con exactitud el número existente aún está en disputa. Aproximadamente 35.000 especies pertenecen al filo *Basidiomycota* englobando así la mayoría de los hongos. Los hongos han sido utilizados desde hace miles de años tanto para fines alimentarios como en la medicina, la recolección e ingesta de los hongos en la vida diaria es una práctica tradicional en diversas culturas y la importancia de consumir estos hongos se debe a su contenido en aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, esteroides y algunos minerales esenciales, por lo que se cree que son coadyuvantes en diferentes tratamientos como el cáncer, la obesidad, diabetes, antioxidantes, entre otros (Thu et al., 2020). *Ganoderma lucidum* es de los hongos más utilizados en la medicina tradicional china, la investigación ha reportado más de 400 compuestos bioactivos (metabolitos) como son los triterpenos, polisacáridos, nucleótidos, esteroides, ácidos grasos, proteínas, péptidos, aminoácidos y oligoelementos, los cuales se han encontrado en el cuerpo

fructífero, las esporas y los micelios, esto nos llevaría al descubrimiento de sustancias biológicamente activas hasta ahora desconocidas, La importancia biológica de los metabolitos secundarios reportada por (Baby et al., 2015) nos conlleva a buscar e identificar qué tipo de metabolitos se encuentran presentes en *Ganoderma lucidum* y cuál será el uso que puede darse al producir el hongo con ciertas características medicinales, sin embargo, existe poca información acerca de las diferencias que expone este hongo al ser producido bajo condiciones y lugares diferentes.

Según (Hennicke et al., 2016) existen diferencias entre los hongos derivado de su cultivo, estas diferencias pueden identificarse a través de estudios morfológicos, análisis filogenéticos moleculares y/o la identificación de los compuestos bioactivos a través de extracciones metanólicas, por lo que este trabajo permitirá identificar los compuestos bioactivos utilizando diferentes técnicas como las pruebas fitoquímicas en las que se identificaran alcaloides, saponinas, flavonas, glucósidos y triterpenos y la espectroscopia de infrarrojo para encontrar dichas diferencias que presentan los hongos.

## **1.4 Objetivos**

### ***1.4.1 Objetivo general***

Evaluar las moléculas bioactivas de los hongos *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino y a través de pruebas fitoquímicas y técnicas espectroscopia de infrarrojo para conocer su composición química ,mediante técnicas microbiológicas conocer el efecto antibacteriano que producen los extractos.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- 1 Extraer los compuestos activos del hongo de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino mediante el método de maceración, utilizando como disolventes agua, metanol y diclorometano.
- 2 Purificar los metabolitos secundarios por métodos cromatográficos de CCF.
- 3 Identificar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino mediante un análisis fitoquímico previo.
- 4 Identificar por espectroscopia de infrarrojo los grupos funcionales de los extractos de *Ganoderma lucidum* nacional y chino.
- 5 Evaluar la capacidad antibacteriana de los extractos obtenidos contra bacterias de tipo ATCC y de aislamiento clínico por el método de Kirby Bauer.
- 6 Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos contra bacterias de tipo ATCC y de aislamiento clínico por el método de microdilución.

#### **1.5 Hipótesis**

Existen diferencias en la composición de las moléculas bioactivas del hongo *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino.

Existe mayor inhibición de los extractos de *Ganoderma lucidum* ante bacterias gran positivas.

## CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Medicina tradicional china

Se estima que existen 1.5 millones de hongos distribuidos en todo el mundo, aproximadamente 2000 de ellos son seguros para la salud humana y 300 tienen propiedades medicinales. Así mismo presentan propiedades farmacológicamente activas, entre ellos se encuentra el *Ganoderma lucidum* que poseen un papel importante para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades por lo que ha sido utilizado en la medicina tradicional china y japonesa como remedio herbal durante más de 2000 años. (Ahmad, 2018).

La Organización Mundial de la Salud estima que tres cuartos de la población mundial dependen de los remedios tradicionales para mejorar su salud, por lo que con el transcurso de los años se han desarrollado múltiples alimentos funcionales que coadyuvan a la salud de los individuos, ya que estos contienen una gran cantidad de componentes bioactivos y potencialmente producen efectos de mejora para ciertos padecimientos. A través de la investigación se ha descubierto que el hongo de *Ganoderma lucidum* posee diversos metabolitos bioactivos (principalmente polisacáridos y triterpenos los cuales han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional china y en la comida funcional durante miles de años. (Guo et al., 2018)

### 2.2 Taxonomía de *Ganoderma lucidum*

El *Ganoderma lucidum* es un basidiomiceto blanco que degrada la madera y produce frutos duros con su putrefacción, es conocido también como Ling-Zhi en chino y Reishi en Japones (Boh et al., 2007). La taxonomía del *Ganoderma lucidum* según el Index Fungorum es la siguiente: pertenece

al Reino *Fungi*, Phylum: *Basidiomycota*, Familia: *Ganodermataceae*, Clase: *Agaricomycetes*, Orden: *Polyporales*, , Género: *Ganoderma* y Especies: *lucidum*. (Sharma et al., 2019)

### **2.3 Metabolitos secundarios de *Ganoderma lucidum*.**

Las plantas presentan dos tipos de metabolismos: primarios y secundarios, el metabolismo primario es aquel que utiliza para sintetizar las moléculas que son importantes para generar la vida como la producción de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los metabolitos secundarios o sustancias bioactivas son aquellas que se derivan de un metabolismo primario pero que no son vitales para el crecimiento o el desarrollo de un organismo, los metabolitos secundarios están presentes en algunas especies y actúan como mecanismo de defensa hacia factores abióticos como virus, bacterias y parásitos, incluso contra rayos solares que pongan en riesgo la vida de la planta, todo esto permite interacciones con el entorno. Estas sustancias le dan las características o propiedades farmacológicas ya que de acuerdo con numerosas investigaciones se han encontrado más de 400 compuestos bioactivos en *Ganoderma lucidum* de los cuales los más abundantes son los triterpenos, polisacáridos, nucleótidos, esteroides, ácidos grasos, proteínas, péptidos, aminoácidos y oligoelementos, estos compuestos bioactivos se han encontrado en el cuerpo fructífero, las esporas y los micelos. (Liu et al., 2014)

Polisacáridos: los glucanos son los principales polisacáridos bioactivos aislados de *Ganoderma lucidum* y sus posibles propiedades biológicas están asociadas con su estructura como son los efectos antiinflamatorios, hipoglucémicos, antiulcerosos, antitumorales e inmunoestimulantes (Sharma et al., 2019). Estos polisacáridos fueron extraídos del *Ganoderma lucidum* con agua usando el método tradicional de decocción y posteriormente con una precipitación con alcohol, los polisacáridos aislados del cuerpo fructífero, los micelos, las esporas y medios de cultivo incluyen a los homo y hetero glucanos, hetero sacáridos con diferentes combinaciones de glucosa, galactosa,

manosa, xilosa, arabinosa y también fructosa. Los (1 → 3) – β-D-glucano se encuentra principalmente en las esporas y son considerados los principales polisacáridos activos, los enlaces (1 → 4) y (1 → 6) – β-D de estos glucanos tienen un potencial antitumoral más fuerte y presentan mejor absorción que otros polisacáridos de *Ganoderma lucidum*. (Liu et al., 2014)

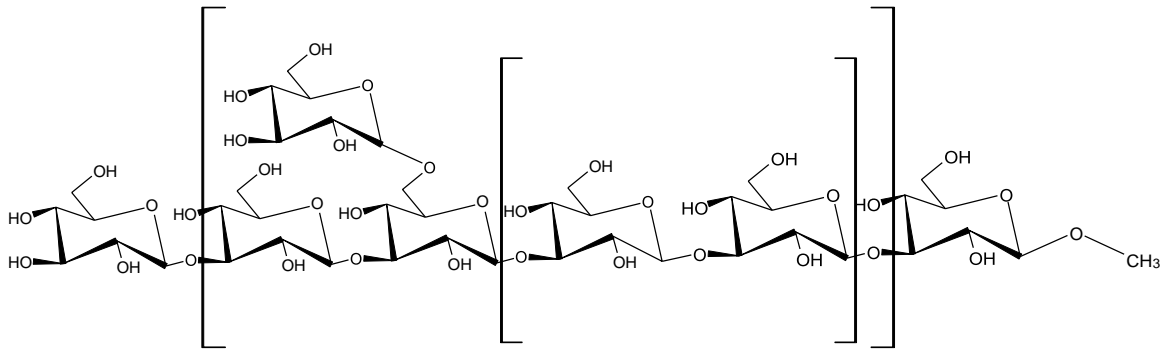


Figura 2.1 Estructura tipo polisacárido de *Ganoderma lucidum* (Ríos-Cañavate, 2008)

Triterpenos: son compuestos naturales y son una subclase de terpenos, estos tienen un esqueleto de 30 carbonos principalmente. Los triterpenos tienen actividades citotóxicas, hepatoprotectoras, hipocolesteromias e hipolipidémicas. (Sharma et al., 2019) Los triterpenoides se han encontrado principalmente en las esporas y a ellos se debe el sabor amargo, se han aislado aproximadamente 29 triterpenos, por ejemplo, el ácido T es el ácido triterpénico el cual es el más abundante, el ácido D ha mostrado efectos anticancerígenos en las pruebas in vitro e in vivo. El Ganoderiol F, es tetracíclico este ácido ha presentado citotoxicidad en varios tipos de células tumorales entre ellos el más importante el cáncer de pulmón. (Sharma et al., 2019)

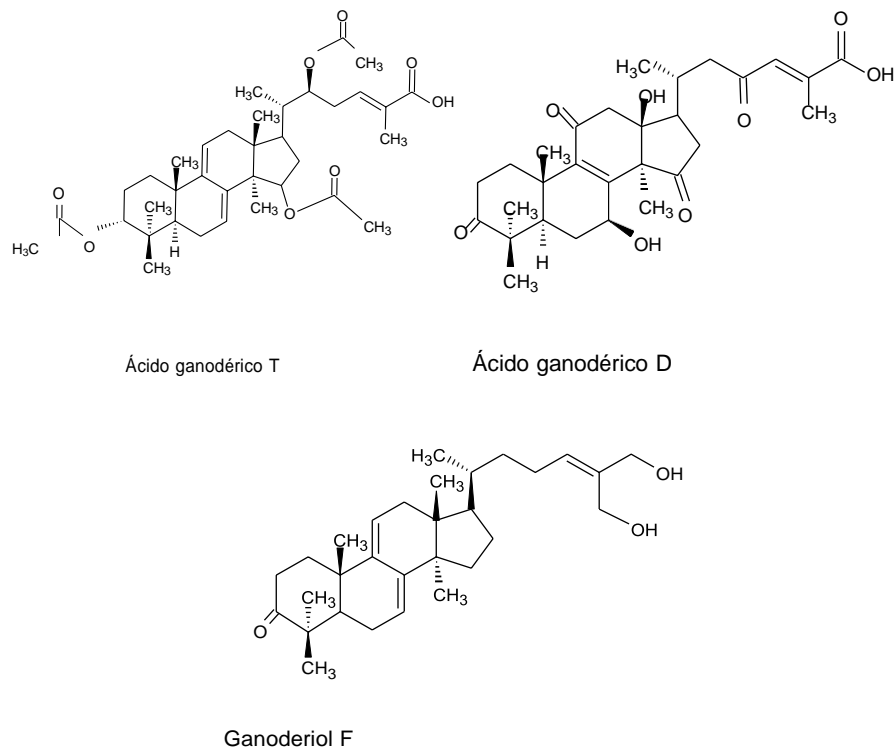


Figura 2.2 Estructuras químicas del ácido ganodérico T, D y ganoderiol F del Lingzy

La primera proteína que se obtuvo del extracto del micelio de *Ganoderma lucidum* fue la Lig Zhhi-8 (Kino et al., 1989), también se han aislado varias enzimas como amilasa, celulasa, carboxil-proteinasa, etc. Los nucleósidos encontrados incluyen a la adenosina, cistidina, guanosina, etc. (Platelet, 1993). Los nucleótidos reportados fueron adenina, guanina, hipoxantina, timina y uracilo. Como se sabe la adenosina tiene un papel importante ya que previene la agregación de plaquetas. Las vitaminas encontradas de *Ganoderma lucidum* comprenden a la  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_6$ ,  $\beta$ -caroteno, C, D y E.

También se han aislado minerales de *Ganoderma lucidum* como calcio, potasio, fósforo, hierro, carbono, magnesio, zinc, cromo, arsénico, cobre, manganeso, silicio, aluminio, cobalto, molibdeno, níquel, plomo y flúor (Adamu & Sakuma, 2012).

## 2.4 Efectos farmacológicos

En la siguiente tabla se muestran los metabolitos encontrados en *Ganoderma lucidum* y sus efectos terapéuticos reportados.

Tabla 2.1 Metabolitos y efectos terapéuticos de *Ganoderma lucidum*

Metabolito	Efecto terapéutico	Metabolito	Efecto terapéutico
	Anti-VIH		Anti ulcerogénico
	Actividad anti nociceptiva		Antioxidante
	Inmunomodulación		Anticancerígeno
	Citotóxico	Carbohidratos	Inmunomodulación
	Antihipertensivo		Hipoglucémico
	Antiinflamatorio		Cardioprotector
	Neuroprotector		Antiangiogénico
Triterpenos /	Antitumoral		Antioxidante P+P1
Triterpenoides	Antiangiogénico		Anti-herpético P+P1
	Apoptosis		Anti-reumático P+P2
	Antihistamínico	Proteínas,	Inmunomodulador
	Antienvjecimiento	aminoácidos,	Antimicrobiano:
	Hípercolesterómico	lectinas	*antiviral
	Anti complemento		*antibacterial
	Anti-proliferativo		*antifúngico
	Anticancerígeno		Mitogénico

	Antioxidante		Anti-tumor
	Hepatoprotector	Nucleósidos,	Anti-mutagénico
	Anti-androgénico	nucleótidos y	Antioxidante
	Absorción de colesterol	RNAs, ácidos	Inmunomodulador
Vitaminas, minerales, esteroles, fibra dietética	Reciclaje de ácidos biliares	grasos, germanio	Antihistamínico
	Anticancerígeno	orgánico	Antiagregación plaquetaria

Fuente: Ahmad et al. 2018

El contenido de las sustancias farmacológicamente activas depende del cultivo de la cepa, así como de la ubicación, las condiciones de cultivo, el crecimiento del hongo, los procedimientos y la preparación de la formulación. (Boh et al., 2007)

#### 2.4.1 Antitumoral

Los extractos de *Ganoderma lucidum* contienen efectos carcinostáticos en diferentes líneas celulares de cáncer como el páncreas, pulmón color, piel, próstata e hígado. Se conoce que los componentes de los hongos como son los polisacáridos y los triterpenos tienen actividad quimiopreventiva y tumorocida, en este caso los triterpenos inducen a la detención del ciclo celular en la fase G1, además de que también inducen apoptosis en líneas celulares de cáncer, sin olvidar que son potentes antioxidantes eliminando los radicales libres. Los polisacáridos tienen la capacidad de mejorar la respuesta inmune del huésped estimulando la producción de macrófagos, células NK y linfocitos T.

Por último, la presencia de estos polisacáridos de *Ganoderma lucidum* afecta diferentes etapas del cáncer, principalmente por 3 medios: 1) inhibición de la angiogénesis; 2) inhibe la metástasis; 3) induce y mejora la apoptosis de las células tumorales. (Sharma et al., 2019)

Ya que la toxicidad de *Ganoderma lucidum* es muy baja este es útil para aquellos pacientes que son sometidos a radioterapia y/o quimioterapia convencional ya que aumenta la resistencia inmune y disminuyen la toxicidad por sus propiedades antitumorales e inmunomoduladores. (M. F. Ahmad, 2018)

#### **2.4.2 Inmunomodulación**

Algunos de los extractos de *Ganoderma* se han identificado como activadores eficientes de células T, las cuales inducen la producción de numerosas citocinas como las interleucinas. Así mismo la sustancia inmunomoduladora bioactiva de *Ganoderma lucidum* (GLIS) que fue aislada del cuerpo fructífero estimula la proliferación, activación y diferenciación de linfocitos B.

#### **2.4.3 Antioxidantes**

Se ha sugerido en (Lu et al., 2020) que el mecanismo antioxidante se debe al suministro de hidrógeno desde el polisacárido el cual se combina con los radicales y luego forma uno más estable para terminar la reacción en cadena radical.

Los antioxidantes protegen los componentes celulares del daño oxidativo por medio de la reducción del riesgo de mutaciones y carcinogénesis. Los antioxidantes también se absorben rápidamente después de ser ingeridos, lo que aumenta la actividad antioxidante en el plasma

humano. Además de todo esto se descubrió que los extractos metanólicos de *Ganoderma lucidum* previenen el daño en los riñones a través de la restauración del sistema de defensa antioxidante renal. (M. F. Ahmad, 2018)

#### **2.4.4 Actividad antibacteriana**

Se ha informado que los componentes antibacterianos encontrados en *Ganoderma lucidum* inhiben las bacterias gram positivas y gram negativas. *Helicobacter pylori* el cual es el responsable de la formación de úlceras gástricas y otras complicaciones gástricas han sido inhibidas por el extracto de *Ganoderma lucidum*, el extracto de metanol mostro también acción antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Sharma et al., 2019)

#### **2.4.5 Actividad antifúngica**

Hay pocos estudios sobre la actividad antifúngica de *Ganoderma lucidum* sin embargo la ganodermina (que es una proteína) la cual ha sido aislada del cuerpo fructífero inhibe el crecimiento del micelo de *Botrytis cinerea*, *Physalospora piricola* y *Fusarium oxysporum*. Otro estudio revelo que el extracto de *Ganoderma lucidum* presento actividad antifúngica contra *Trichoderma viride*. (Sharma et al., 2019)

#### **2.4.6 Actividad antiviral**

En otras investigaciones se demostró que los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma lucidum* inhibieron los efectos citopáticos del virus de la estomatitis y el virus del herpes simple.

Existen otros estudios en los que también se ha encontrado este efectos de los extractos. (Sharma et al., 2019)

## **2.5 Métodos de extracción**

Algunos de los métodos de extracción más utilizados para llevar a cabo la extracción de metabolitos secundarios son los reportados por Rivas-Morales (2016), cada método considera las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos:

a) Maceración, b) Lixiviación, c) Soxhlet y d) Arrastre por vapor de agua y se describen brevemente a continuación:

a) Maceración.

La extracción por maceración es un método líquido-sólido en donde la muestra es soluble con el líquido de extracción. El material por extraer se corta en partes pequeñas y se coloca en recipientes, posteriormente se agrega el solvente seleccionado por polaridad y dejándolo en reposo o en agitación continua a una temperatura constante.

b) Lixiviación

La extracción por lixiviación es un método que se produce por el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido, el material fresco se coloca en recipientes a temperatura ambiente durante 3 días pudiendo ser acetona o alguna mezcla de solventes de acuerdo con las características del material de estudio, en este método no es necesario cortar el material en trozos pequeños, finalmente se decanta y se evapora en rotavapor.

c) Soxhlet

El proceso de extracción por Soxhlet es un método continuo, el material se coloca dentro de un cono de papel filtro grueso que previamente se introdujo a la cámara principal del extractor Soxhlet

donde se hace pasar el solvente, este procedimiento se repite varias veces y en caso necesario por varias horas o días. Para esta extracción el material a analizar se puede dividir en diferentes partes como lo son la parte aérea y la raíz. La planta seca y molida se coloca en el Soxhlet con éter o hexano durante 7 días a una temperatura de 20° C – 30° C, cuando termina el tiempo se observará si hay un precipitado y en caso de haberlo deberá filtrarse y evaporarse.

#### d) Arrastre por vapor

El arrastre por vapor como método de extracción se utiliza principalmente para aceites esenciales, estos contienen compuestos orgánicos que se producen en las plantas y son extraídos con el uso de vapor saturado a presión atmosférica.

## **2.6 Cromatografía en capa fina (CCF)**

Técnica analítica con la que separa una mezcla de compuestos y se determina su pureza. La muestra por analizar se coloca en una lámina de vidrio o aluminio la cual previamente fue cubierta con una capa fina de absorbente de 0.1 mm de espesor, a esto se le llama la fase estacionaria. Posteriormente esta lamina se introduce en una cubeta cerrada conteniendo en la misma uno o varios disolventes mezclados, a esto le llamaremos la fase móvil. La mezcla subirá por la lámina por capilaridad haciendo una separación diferencial de los productos que se encuentran presentes. La relación entre las distancias recorridas por el producto y el solvente desde el punto de aplicación de la placa se le conoce como frente de retención ( $R_f$ ). Para realizar el cálculo de  $R_f$  se mide la distancia que recorrió el compuesto hasta el centro de la mancha y se utiliza la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el producto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

El disolvente se elegirá dependiendo de la polaridad de menor a mayor, se puede realizar una

prueba preliminar sobre una placa de 2 X 5 cm y sumergiéndola en un recipiente de vidrio con tapa y el solvente o la mezcla de solventes a elegir y observando el desplazamiento de la muestra. (Rivas-Morales et al., 2016)

## 2.7 Reveladores

En su mayoría las placas cromatográficas tienen un indicador fluorescente con el cual se observan los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm y 365 nm), Este indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. Para aquellos compuestos que no absorben la luz UV se deberá utilizar un agente revelador que reaccionará con los productos absorbidos y producirá un compuesto colorido. La exposición de la placa a los vapores de amoniaco seguida de la luz UV producirá una fluorescencia intensa que permitirá observar los compuestos presentes. (Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, 2015)

Tabla 2.2 Reveladores usados en la CCD para identificar flavonoides

Reveladores	Descripción del resultado
Tricloruro de amonio (1%)	Fluorescencia a la luz UV
NaOH 2% NH <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.2%	Múltiples compuestos fenólicos revelan de varios colores
<i>p</i> -nitroanilina 0.2% diazotada y Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20%	Todos los compuestos fenólicos revelan con varios colores
Difenilborato al 1% en metanol	Todos los flavonoides pueden revelar mostrando colores amarillo, naranja o verde

FeCl <sub>2</sub> 1% en solución salina	Muchos compuestos fenólicos muestran colores azul verde, marrón o rojo
Vainilla/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Diversos compuestos fenólicos exhiben coloraciones amarillo o fucsia
Ce(SO <sub>4</sub> )/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Revelador general que proporciona un color generalmente pardo oscuro

Fuente: Osmany Cuesta et al., 2015

## 2.8 UV-Vis

Técnica espectroscópica que se basa en el estudio de la interacción de las radiaciones electromagnéticas con las moléculas, la energía de esta radiación electromagnética que proviene de la región UV-Vis produce saltos electrónicos entre un estado base y un estado excitado. Aquellas transacciones asociadas con electrones ( $\pi^*$  y  $\pi-\pi^*$ ) son las más valoradas en la práctica por que se pueden visualizar por arriba de 200 nm y generalmente este valor es en el que se empiezan a registrar los espectros UV-Vis. Los electrones sigma ( $\sigma$ ) que se encuentran presentes en todos los compuestos orgánicos absorben las radiaciones electromagnéticas de más alta energía al que se le llama UV lejano. La aplicación de esta técnica sirve para diferenciar los flavonoides ya que los máximos de absorción de los espectros UV-Vis presentan desplazamientos muy definidos con algunos reactivos. La información obtenida acerca del comportamiento de flavonoides con esta técnica corresponde a flavonas y flavonoles que se puede observar en el rango entre 300-380 nm asignada como banda I.

## 2.9 Espectroscopia infrarroja (IR)

La zona del visible y las microondas se extiende en la región infrarroja del espectro electromagnético, la sección entre 4000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  es la de mayor utilidad para caracterización estructural y es llamada región infrarroja media. Al contar con una amplia base de datos de espectros IR nos permite utilizar esta técnica para identificar rápidamente componentes de mezclas orgánicas. A pesar de que cada espectro IR caracteriza a un compuesto, también se sabe que ciertas agrupaciones atómicas resultan siempre en un determinado intervalo de frecuencias, independientes a las demás, por lo tanto, estas bandas serán características de ciertos grupos funcionales como se muestra a continuación:

Tabla 2.3 Agrupamientos funcionales por intervalos de frecuencia

Intervalo de frecuencia	Tipo de vibración	Grupos funcionales
3500 – 3300 $\text{cm}^{-1}$	Tensión O-H:	Grupos fenólicos
3100 – 3000 $\text{cm}^{-1}$	Tensión $\text{C}_{\text{sp}2}$ -H:	Carbonos aromáticos
3000 – 2850 $\text{cm}^{-1}$	Tensión $\text{C}_{\text{sp}3}$ -H:	Grupos $\text{CH}_3$ y $\text{CH}_2$
1750 – 1680 $\text{cm}^{-1}$	Tensión CO:	Grupo carbonilo
~1600 -1450 $\text{cm}^{-1}$	Tensión $\text{C}_{\text{sp}2}$ - $\text{C}_{\text{sp}2}$ :	Anillos aromáticos
~1460 – 1370 $\text{cm}^{-1}$	Flexión $\text{C}_{\text{sp}3}$ -H:	Grupos $\text{CH}_3$ y $\text{CH}_2$

Fuente: (Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, 2015)

## 2.10 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico nos permite determinar cualitativamente los principales grupos de metabolitos que se encuentran presentes en una especie vegetal a través de diversas pruebas, en su

mayoría colorimétricas como por ejemplo la identificación de alcaloides, saponinas, glucósidos y triterpenos entre otros (Rivas-Morales et al., 2016).

### **2.10.1 Alcaloides**

Son compuestos nitrogenados que se clasifican de acuerdo con su estructura, actividad biológica o por su origen biosintético. Las funciones biológicas que se le atribuyen a los alcaloides esta la defensa química contra herbívoros o depredadores, como agente antibacteriano, antifúngico y antiviral. Farmacológicamente funcionan como reductores de la presión sanguínea, estimuladores de la circulación y la respiración, algunos pueden ser antitumorales y analgésicos (Ochoa & Sarmiento, 2018).

### **2.10.2 Glucósidos cardiotónicos**

Pertenecen a un grupo de metabolitos secundarios de tipo esteroidal con uno o más azúcares, los principales fármacos de este género se utilizan para la insuficiencia cardiaca y cardiopatías congénitas entre otras.

### **2.10.3 Triterpenos**

Son terpenos con seis unidades de isopreno, estos pueden ser tetracíclicos o pentacíclicos con grupos de hidroxilo, aldehídos, cetonas o ácidos carboxílicos. En la industria farmacéutica han sido utilizados por su actividad citotóxica, antimicrobiana, anticonceptiva y como antiinflamatorio.

### **2.10.4 Flavonoides**

Son compuestos que se caracterizan por una estructura benzo- $\gamma$ -pirano, contiene dos anillos aromáticos unidos por un anillo pirano. Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, así

como también relajantes sobre el musculo liso vascular.

## **2.11 Antibiograma de discos, técnica de Kirby Bauer**

Para el correcto manejo de la enfermedad infecciosa es necesario identificar el agente causal de la misma, en medida de lo posible se logrará un control específico al conocer el microorganismo presente, así como los agentes antimicrobianos que sean de fácil administración, tengan baja toxicidad y que sean activos contra el microorganismo que causó la enfermedad. Se deberán realizar estudios de sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos, los cuales permitirán conocer qué clase de antibiótico es eficaz en el tratamiento, por lo que es necesario que estos procedimientos sean confiables para evitar el uso indiscriminado de antibióticos y la selección de cepas resistentes ya que con los años ha ido en aumento según investigaciones recientes. El antibiograma de discos es el sistema más utilizado para microorganismos de crecimiento rápido, su correcto seguimiento y aplicación asegurará un resultado confiable, esta prueba de sensibilidad en la que se utiliza el procedimiento del disco es una modificación de la técnica que describieron Bauer, Kirby, Sherris y Turk, es una prueba que se puede reproducir, es rápida y práctica (Bernal R. & Guzmán, 1984).

### **2.11.1 Discos para antibiograma**

Los discos que se utilizan en el antibiograma clínico son generados por casas comerciales y estos siguen los protocolos de control internacional, cada disco tiene una concentración que permite realizar una correlación más o menos precisa con la concentración mínima inhibitoria que el antibiótico alcanza "in vivo". La confiabilidad de los resultados depende de la conservación de los discos por lo que esta deberá ser crítica manteniéndolos en refrigeración entre 4-5 °C o

almacenándolos a -20 °C hasta que sean utilizados (Bernal R. & Guzmán, 1984).

### **2.11.2 Cepas de control**

Además de asegurar que la técnica sea la correcta, la introducción de cepas de control bajo un control de calidad permitirá que se obtengan resultados confiables, estas cepas son de uso universal y se trata de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* las cuales cuentan con un patrón de sensibilidad conocido frente a los antimicrobianos, estas cepas de control deben probarse cada vez que se realice la prueba, también se deberá medir y registrar los halos de inhibición para cada antibiótico, los halos deberán encontrarse dentro del rango conocido (Bernal R. & Guzmán, 1984).

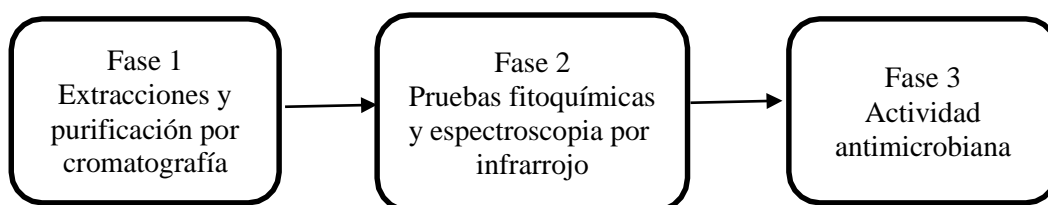
### **2.11.3 Medio de cultivo**

El medio utilizado es Mueller-Hinton el cual se prepara de acuerdo con las indicaciones descritas en el envase en cajas Petri estériles, una vez listo el medio puede utilizarse inmediatamente o conservarse en refrigeración hasta por dos semanas asegurando que las cajas de Petri no provoquen evaporación (Bernal R. & Guzmán, 1984).

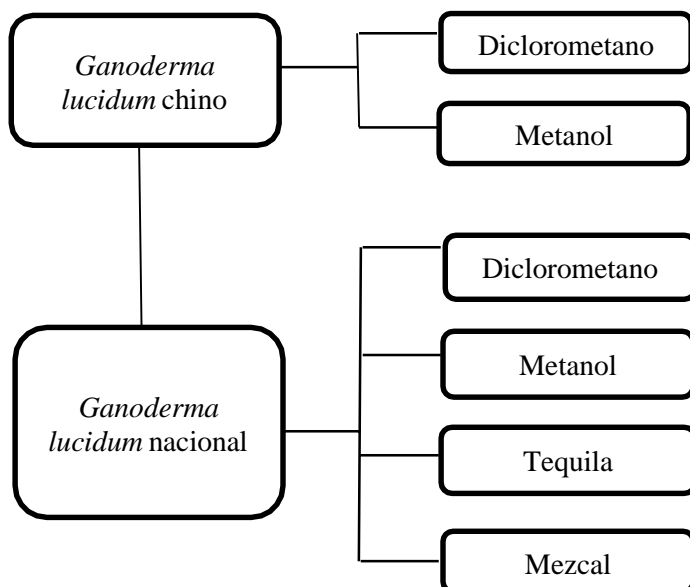
## CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Diseño metodológico

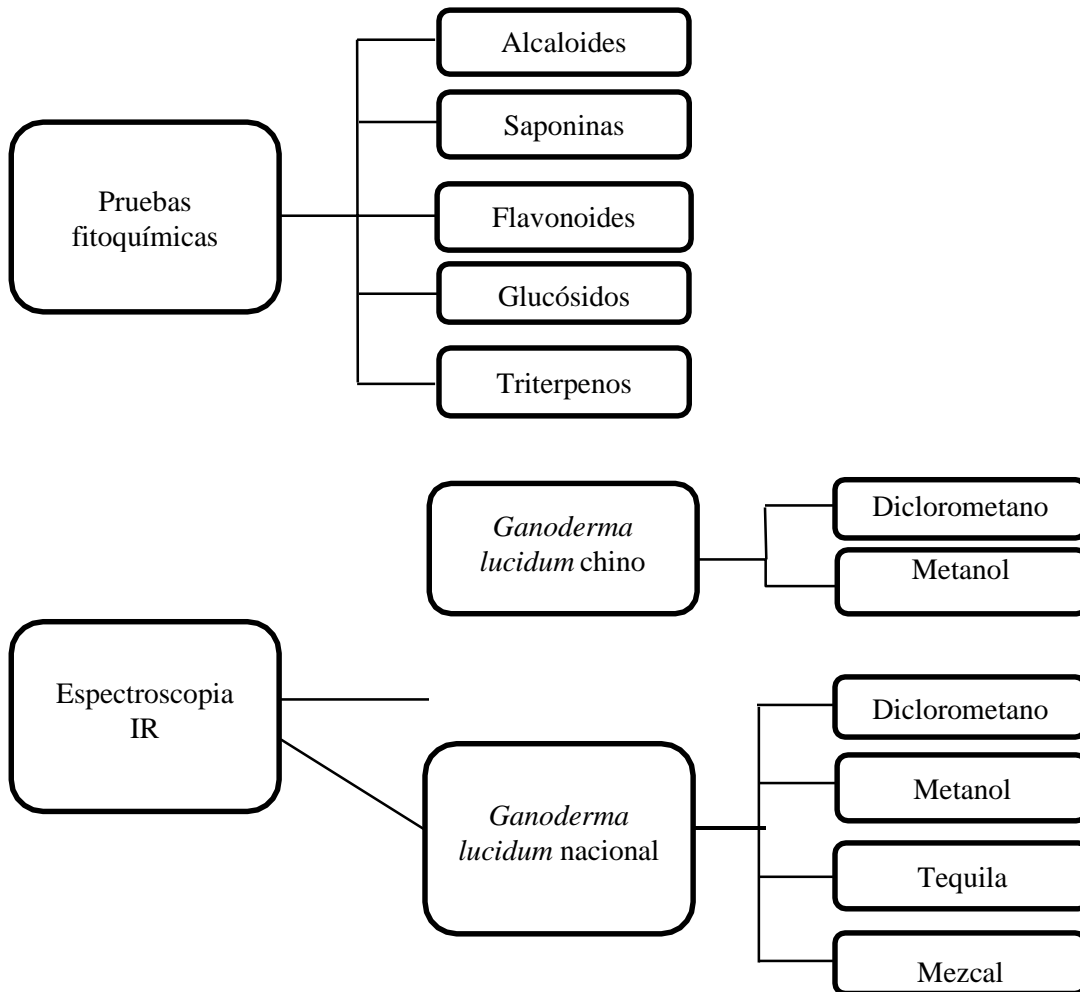
El esquema metodológico que se presenta a continuación muestra de manera desglosada y por fases los materiales y métodos empleados durante el experimento:



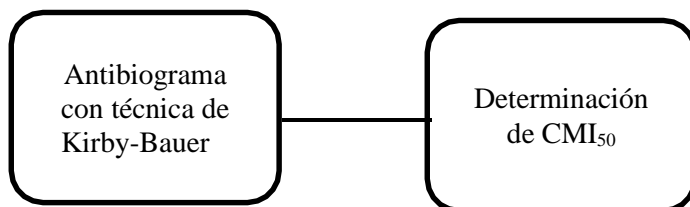
Fase 1: Extracciones y purificación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina



Fase 2: Pruebas fitoquímicas y espectroscopia por infrarrojo



Fase 3: Actividad antimicrobiana



Se realizó el experimento de extracción y purificación descrito en la fase 1 por triplicado para ambas muestras de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino.

### 3.2 Obtención e identificación de las muestras de *Ganoderma lucidum*

Las muestras de *Ganoderma lucidum* proveniente de China se compraron vía internet, las cuales se identificaron con las características fisiológicas del hongo, en la primera recepción se observaron cortes longitudinales y en la segunda recepción se obtuvo la pieza completa por lo que se tuvo que cortar en partes pequeñas para proceder con la maceración, en ambos casos se observó deshidratación del cuerpo fructífero.



Figura 3.1 *Ganoderma lucidum* chino a) pieza completa b) cortes longitudinales

La muestra de *Ganoderma lucidum* mexicana fue obtenida de la nave para el cultivo de hongos ubicado en San Isidro Buensuceso, Tlaxcala. Estas muestras se identificaron con las características fisiológicas del hongo: carpóforo con forma variable (forma de riñón, semicircular, forma de espátula y/o de abanico) en tamaño se encontró dentro de los 15 cm de diámetro, con color caoba y olor característico del hongo. La superficie es lisa y ligeramente ondulada la cual está cubierta de una especie de barniz brillante, la primera recepción fue un trozo de pieza la cual se cortó en

partes más pequeñas, la segunda recepción fue tomada directamente de la cosecha, ambas muestras se deshidrataron por 72 horas en la estufa a 65 °C.



Figura 3.2 *Ganoderma lucidum* nacional a) pieza completa b) trozos

### 3.3 Obtención de los extractos por maceración

Todas las muestras del hongo de *Ganoderma lucidum* de origen nacional y chino se pesaron (18 g) y colocaron en matraz Erlenmeyer con 200 mL de diferentes solventes para poder extraer la mayor cantidad de metabolitos secundarios, por orden de polaridad se utilizaron el diclorometano, etanol, tequila (Don Julio) y mezcal (tóbala). Permanecieron en estas soluciones por 72 horas según lo recomendado por (Meneses et al., 2016)

Posteriormente las muestras fueron filtradas con papel Whatman N° 4 y se evaporaron a presión reducida en un rotavapor Büchi (buchi labortechik, 2016) según la técnica establecida (Platelet, 1993).

Se modificaron las condiciones del rotavapor para cada disolvente, para el extracto de *Ganoderma lucidum* nacional y chino en diclorometano se mantuvo una temperatura del agua de la tina en 30 °C con vacío en la bomba de extracción en 500 mbar.

Para el extracto de *Ganoderma lucidum* nacional y chino en etanol la temperatura del agua de la tina fue de 40 °C con vacío en la bomba de extracción de 80 mbar.

Las muestras de *Ganoderma lucidum* chino maceradas en tequila y mezcal fueron concentradas con las siguientes condiciones: 45 °C la temperatura de la tina y 30 mbar la bomba de vacío.



Figura 3.3 Equipo de rotavapor concentrando los extractos de *Ganoderma lucidum* chino y nacional en diclorometano y metanol.

### **3.4 Separación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina (CCF)**

Los extractos obtenidos de *Ganoderma lucidum* en diclorometano y etanol fueron colocados en placas TLC de sílica gel de 3 X 5 cm, evaluando la cantidad de metabolitos extraídos con los dos solventes. Se utilizó un sistema de hexano-acetato de etilo con diferente relación. Para el caso del

extracto de *Ganoderma lucidum* chino se utilizó el sistema 4:1 hexano-acetato de etilo y para el *Ganoderma lucidum* nacional se probó con dos sistema 4:1 y 6:1 1 hexano-acetato de etilo.

Los extractos fueron purificados colocando las muestras en las placas TLC sílica gel de 20 X 20 cm y sumergidos en una cubeta cerrada con diferentes sistemas 4:1 hexano - acetato de etilo y 6:1 hexano-acetato de etilo para observar el reparto de los productos presentes en la muestra a lo largo de la placa. Se realizó la remoción y evaporación de estos metabolitos para su identificación final.

### **3.5 Espectroscopia UV-Vis**

Posteriormente estos metabolitos fueron identificados utilizando el Espectrofotómetro UV-VIS modelo UVGL-25 a una longitud de onda de 254 nm y 365 nm para observar el número de metabolitos fluorescentes, se calcularon los  $R_f$  de cada extracto en la placa cromatográfica.

Finalmente se utilizó el agente revelador (molibdato de amonio) para aquellos metabolitos que no absorben la luz ultravioleta y pueden ser observados con este revelador. (Rivas-Morales et al., 2016)

### **3.6 Pruebas fitoquímicas**

A los extractos obtenidos se les realizaron las pruebas fitoquímicas correspondientes establecidas por (Rivas-Morales et al., 2016), estas pruebas son cualitativas y se utilizan como técnicas preliminares para identificar los principales metabolitos secundarios de los extractos a estudiar. Las pruebas fitoquímicas suelen tener un método simple y rápido que se basan en reacciones químicas dando como resultado precipitados, cambios de coloración y presencia de espuma, sin embargo, no proporciona información cuantitativa, por lo que no deberá emplearse como método definitivo (Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, 2015).

### 3.6.1 Alcaloides

Se tomó una porción de la muestra (en la punta de una espátula) y se disolvió en 2 mL de ácido clorhídrico al 50%, se filtró hasta que este se observó completamente transparente, posteriormente se tomó una alícuota y se agregó el reactivo de Wagner y Mayer, se consideró positiva la muestra si aparece un precipitado en la misma. El reactivo de Mayer se preparó disolviendo 1.36 gr de cloruro de mercurio (HgCl) en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio (KI) en 10 mL de agua, se juntan las dos soluciones y se afora a 100 mL con agua destilada. El reactivo de Wagner se preparó disolviendo 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de KI en 20 mL de agua, la solución se aforó con agua destilada a 100 mL.

Al utilizar el reactivo de Mayer éste precipita los alcaloides (Orantes, 2008) el yoduro de potasio hace reacción con el cloruro de mercurio y se forma un precipitado rojo de yoduro de mercurio, este es soluble en exceso de iones de yoduro dando la formación de un anión complejo incoloro (Coy, Parra & Cuca, 2014).

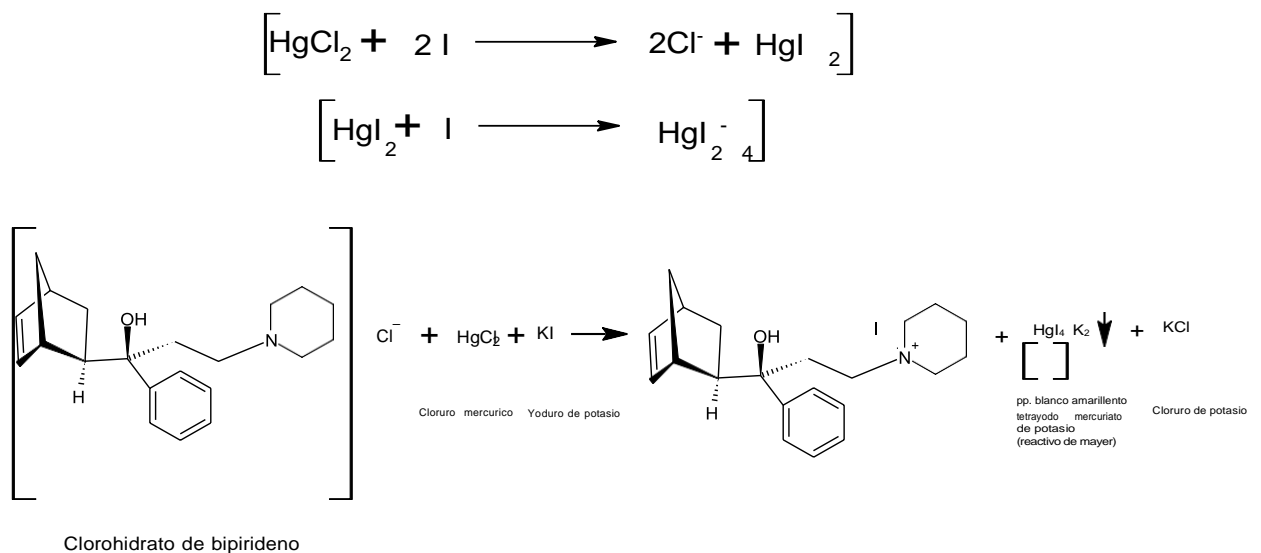


Figura 3.4 Reacción de precipitación con reactivo de Mayer

### 3.6.2 Saponinas

Se tomó una porción de la muestra (10 mg aprox.) y se colocó en un tubo de ensaye, para disolver se agregó agua caliente (40 °C) se dejó reposar de 15 a 30 minutos y se agitó de 1 a 2 minutos, la aparición de espuma que permanece con forma de panal dará positiva la prueba,

Las saponinas son glicósidos por lo que su aglicona tiene un núcleo esteroidal o triterpénico, y esta al poseer propiedades anfóteras les permite actuar como tensioactivos. En esta prueba la presencia de espuma indicara que las saponinas inestabilizaron la membrana celular para posteriormente romperla. (Rojas et al., 2009)

### 3.6.3 Flavonoides

Prueba de shinoda, se colocó en un tubo de ensaye la muestra diluida posteriormente se agregó un trocito de viruta de magnesio y 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Si la coloración resultante va del rojo a magenta indica una presencia de flavonas o dihidroflavona.

La reacción que ocurre al realizar la prueba de shinoda es cuando el magnesio en medio ácido reduce a los flavonoides presentándose un producto coloreado que va del rojo anaranjado a violeta, con la siguiente reacción:

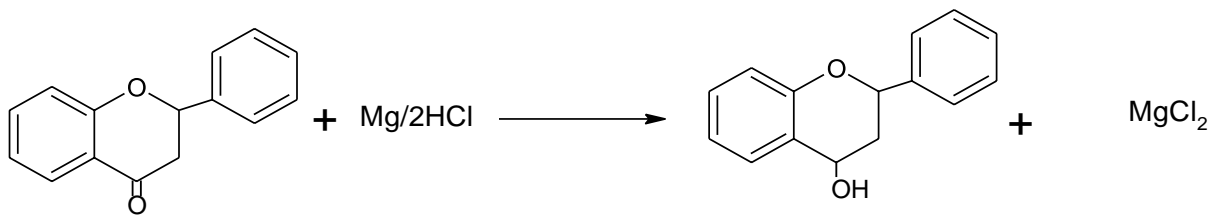


Figura 3.5 Reacción química de la prueba de Shinoda para detección de flavonoides.

### 3.6.4 Glucósidos

Prueba utilizada Baljet, al extracto diluido se agregaron gotas del reactivo de Baljet A y gotas del reactivo de Baljet B, la prueba se consideró positiva si cambió de coloración naranja o roja por lo que se encontrara un glucósido en esa muestra.

La prueba de Baljet identifica lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas y forma un complejo entre el ácido pícrico y la lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada la cual presenta el color rojo claro a oscuro. (Orantes, 2008) (Ardila, 2014)

Para la preparación del reactivo de Baljet se emplean dos soluciones: para la solución A se agrega 1 g de ácido pícrico y se afora con etanol a 100 mL, para la solución B se agregan 10 g de hidróxido de sodio y se afora con agua a 100 mL. Ambas soluciones se mezclan para dar lugar al reactivo.

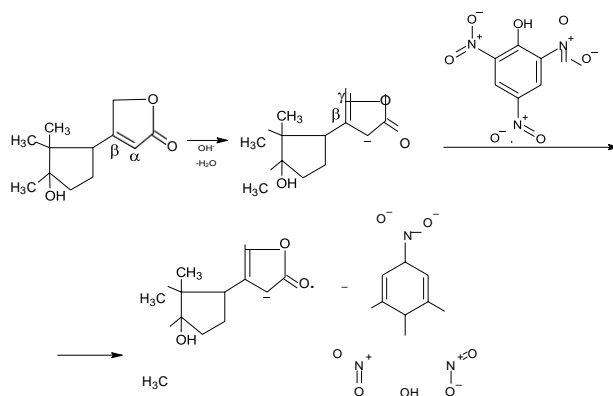


Figura 3.6 Reacción de Baljet para identificación de terpenos y esteroides.

### 3.6.5 Triterpenos

Se disolvió una porción de la muestra en 1 mL de cloroformo y se agregó 1 mL de anhídrido acético resbalando por las paredes del tubo de ensaye. El cambio de coloración a rojo, rosa, verde, púrpura o azul indican positiva la muestra al agregar 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico.

### **3.7 Análisis por espectroscopia de Infrarrojo.**

Se utilizó la técnica de Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (TF-IR) (Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, 2015) para la identificación de los grupos funcionales de los extractos obtenidos, el equipo utilizado fue de la marca Brunker y se emplearon celdas de KBr, el rango de longitud establecido fue de 4000- 600  $\text{cm}^{-1}$ . Este estudio se llevó a cabo en los laboratorios del CESAT.

### **3.8 Efecto antimicrobiano de los extractos con diclorometano y metanol de *Ganoderma lucidum* de origen chino y nacional**

Se empleó la técnica de Kirby-Bauer, en la que se utilizó como medio el agar Mueller-Hinton.

Con una asa estéril se tomó una colonia de cada microorganismo: *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida albicans* 682444, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* 68110F, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* 0682380 las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio estatal de Puebla de la Secretaria de Salud del Estado de Puebla, posteriormente se realizó un cultivo masivo sobre la superficie de la placa y se impregnaron los sensidiscos con los extractos de *Ganoderma lucidum* nacional y chino con diclorometano y metanol, se colocaron en cada caja identificando los cuadrantes con cada uno de estos extractos. Finalmente se incubo por 24 horas a una temperatura constante de 37 °C. Transcurrido el tiempo se leyeron las placas para observar si había presencia de halos de inhibición en cada una de las placas.

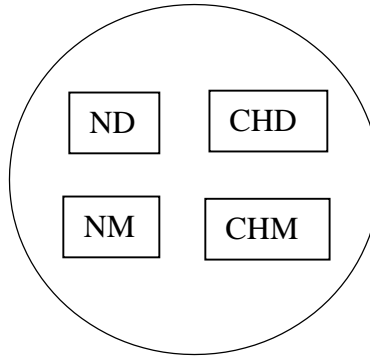


Figura 3.7: Distribución de los discos en el medio de cultivo: ND: *Ganoderma lucidum* nacional con diclorometano, NM: *Ganoderma lucidum* con metanol, CHD: *Ganoderma lucidum* chino con diclorometano, CHM: *Ganoderma lucidum* con metanol.

### **3.9 Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso y metanólico de *Ganoderma lucidum* nacional.**

El método de concentración mínima inhibitoria se utilizó para determinar la concentración más baja del extracto que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación, las cepas utilizadas durante el experimento fueron: *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida albicans* 682444, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* 68110F, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* 0682380 las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio estatal de Puebla de la Secretaria de Salud del Estado de Puebla, se utilizaron microplacas de 108 pocillos a las cuales se les agrego el extracto acuoso y metanólico en diferentes concentraciones a cada una de las cepas y se les agregó caldo Muller Hinton. Se corrió un blanco y control para cada cepa. Las placas se incubaron por 24 horas y se leyeron en el fotómetro Thermo scientific multiskan FC.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.1 Extracción y separación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de *Ganoderma lucidum* chino

La cromatografía en capa fina es una técnica sencilla y rápida que puede ser empleada para la detección de metabolitos secundarios, en este experimento se pesó en la báscula analítica 18 g de la muestra y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 200 mL del solvente diclorometano, después de la concentración se obtuvo 0.1154 g del extracto. El extracto presenta un color marrón y olor característico del *Ganoderma lucidum* de acuerdo a lo reportado en la bibliografía por (Siwulski et al., 2015). Posteriormente el extracto se plaqueó utilizando la técnica de cromatografía de capa fina en un sistema 4:1 (hexano-acetato de etilo) como lo indica (D. Z. Liu et al., 2014) para posteriormente revelarlo en luz ultravioleta y en molibdato. Se observó el desplazamiento de los metabolitos a lo largo de la placa, finalmente se calcularon los  $R_f$ .

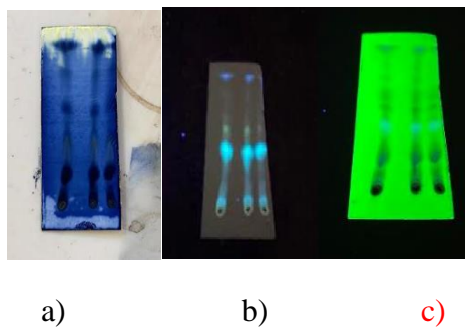


Figura 4.1. Análisis por cromatografía de capa fina de *Ganoderma lucidum* chino utilizando el sistema 4:1 hexano-acetato, a) lectura en UV corta (254 nm), b) lectura en UV larga (365 nm) y c) revelado en molibdato

El cálculo de los  $R_f$  de la misma placa tomando en cuenta 3 puntos se realizó empleando la

siguiente formula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el producto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

$$R_f 1 = 0.214$$

$$R_f 2 = 0.428$$

$$R_f 3 = 0.928$$

Posteriormente se colocaron las muestras de los extractos del hongo chino en diclorometano y metanol en placas de silica gel de 60 F<sub>254</sub> 20 X 20 cm para purificar los metabolitos presentes.

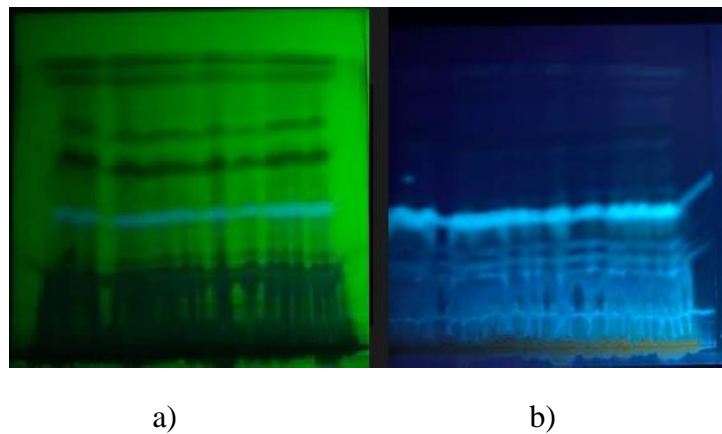
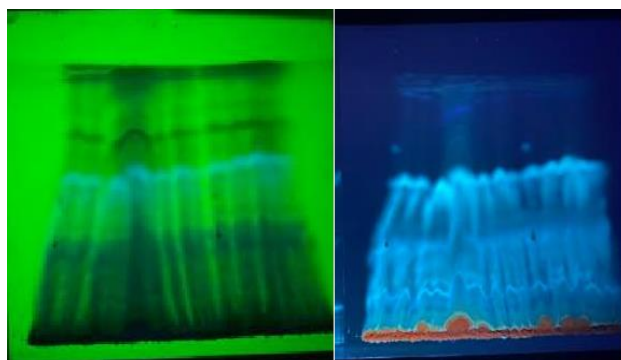


Figura 4.2 Separación de metabolitos secundarios del extracto de *Ganoderma lucidum* chino con diclorometano por cromatografía de capa fina utilizando el sistema 4:1 hexano-acetato de etilo, a) lectura en UV corta (254 nm), b) lectura en UV larga (365 nm)



a)

b)

Figura 4.3 Separación de metabolitos secundarios del extracto de *Ganoderma lucidum* chino con metanol por cromatografía de capa fina utilizando el sistema 4:1 hexano-acetato de etilo, a) lectura en UV corta (254 nm), b) lectura en UV larga (365 nm)

Se puede observar en las placas obtenidas que el metanol desplazo mayor cantidad de metabolitos secundarios que el diclorometano no pudo extraer, sin embargo, existen una señal que se logra percibir en ambos extractos la cual se identifica por su fluorescencia en ambas longitudes de onda.

El cálculo de  $R_f$  obtenido para esta señal es el siguiente:

$$R_f \text{ diclorometano} = 0.4761$$

$$R_f \text{ metanol} = 0.4775$$

#### **4.1.2 Extracción y separación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de *Ganoderma lucidum* nacional**

El rendimiento del *Ganoderma lucidum* nacional al deshidratarlo fue del 91.5% con humedad del 8.5%, se tomaron dos muestras de 18 g respectivamente para macerar con 200 mL de los solventes diclorometano y etanol de estos extractos se obtuvieron 0.1244 g con diclorometano y 0.1195 g

con etanol. Se realizaron los plaqueos utilizando el mismo sistema sin embargo al observar que la muestra no se desplazaba correctamente se cambia el sistema a 6:1 (hexano-acetato de etilo) para hacerla más polar.

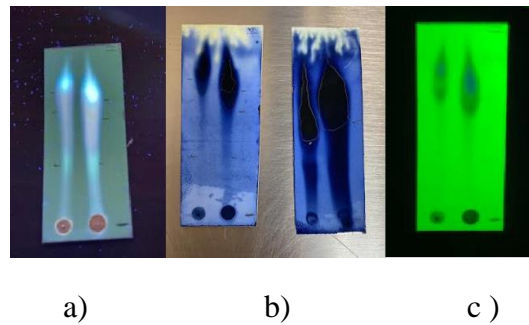


Figura 4.4 Análisis por cromatografía de capa fina de *Ganoderma lucidum* nacional utilizando el sistema 4:1 hexano-acetato de etilo, a) lectura en UV corta (254 nm), b) lectura en UV larga (365 nm) y c) revelado en molibdato.

Se observa un solo metabolitos desplazado, se emplea la misma fórmula para el cálculo de  $R_f$

$$R_f 1 = 0.681$$

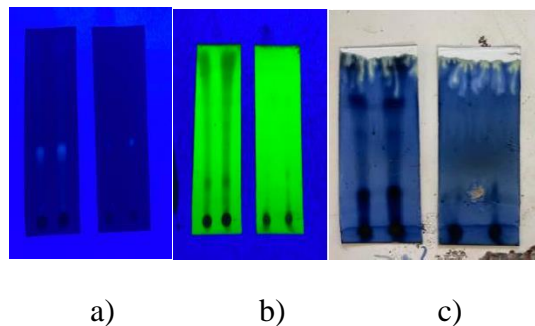


Figura 4.5 Análisis por cromatografía de capa fina utilizando de *Ganoderma lucidum* nacional el sistema 6:1 hexano-acetato de etilo, a) lectura en UV corta (254 nm), b) lectura en UV larga (365 nm) y c) revelado en molibdato

Al cambio de sistema 6:1 (hexano-acetato de etilo) se observa el desplazamiento de 2 metabolitos en las placas, se calcula el  $R_f$  con la misma fórmula:

$$R_f 1= 0.232$$

$$R_f 2= 0.977$$

Posteriormente se realiza la separación de los metabolitos secundarios del extracto de *Ganoderma lucidum* nacional en diclorometano y metanol por cromatografía de placa fina.

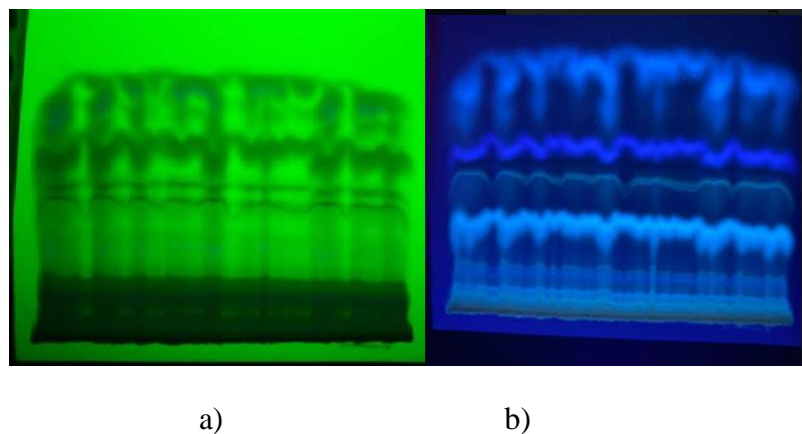


Figura 4.6 Separación de metabolitos secundarios del extracto de *Ganoderma lucidum* nacional con diclorometano por cromatografía de capa fina utilizando el sistema 4:1 hexano-acetato de etilo, a) lectura en UV corta (254 nm), b) lectura en UV larga (365 nm)

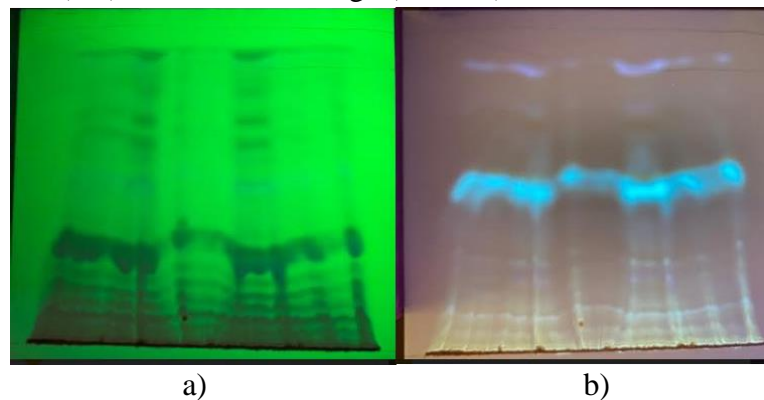


Figura 4.7 Separación de metabolitos secundarios de *Ganoderma lucidum* nacional con metanol por cromatografía de capa fina utilizando el sistema 6:1 hexano-acetato de etilo para el extracto de

metanol, a) lectura en UV corta (254 nm), b) lectura en UV larga (365 nm)

#### 4.1.3 Extracción de *Ganoderma lucidum* chino en tequila y mezcal

Se deshidrato 200 g de hongo en la estufa a 65 °C por 72 horas se obtuvo un rendimiento del 89.57% con humedad de 10.43%, posteriormente se colocaron 93.45 y 90.17 g respectivamente a macerar con 700 mL de tequila blanco y 1000 mL de mezcal tóbala.

El volumen obtenido después de la filtración en ambos casos fue casi del 50% obteniendo 350 mL de tequila y 550 mL de mezcal.

Estas soluciones fueron concentradas en el rotavapor bajos las condiciones ya mencionadas, se realizó el plaqueo en cromatografía de capa fina obteniendo los siguientes resultados:

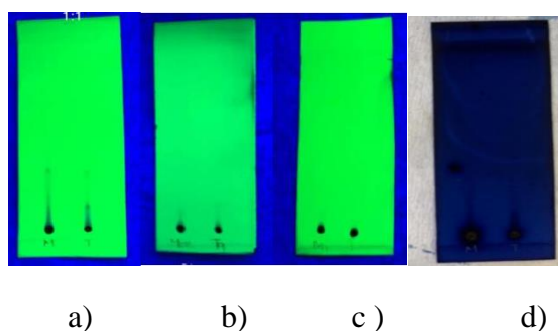


Figura 4.8 Análisis por cromatografía de capa fina de *Ganoderma lucidum* chino con tequila y mezcal utilizando los sistema a) 8:1 hexano-diclorometano, b) 5:1 hexano-diclorometano, c)1:1 hexano-diclorometano y d) revelado en molibdato.

No se observó desplazamiento de la muestra en las placas aun probando con diferentes sistemas (hexano-diclorometano), probablemente esto se debió a la degradación de los metabolitos con el paso del tiempo. Sin embargo, se realizó nuevamente la extracción y plaqueo para detectar los metabolitos presentes en estos solventes y se encontró que a pesar de varias pruebas en diferentes sistemas solo se logró desplazar ciertos metabolitos cuando se ocupa el acetato de etilo como único solvente.

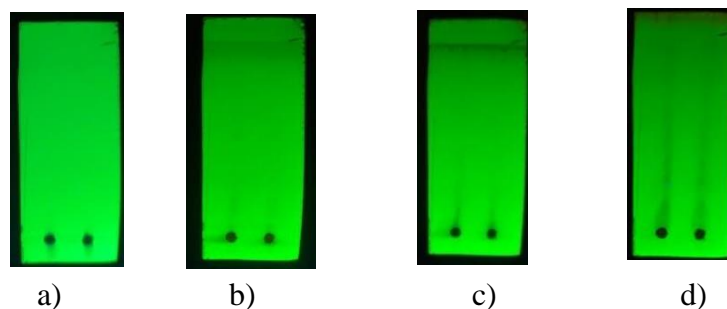


Figura 4.9 Análisis por cromatografía de capa fina de *Ganoderma lucidum* chino con tequila y mezcal utilizando los sistema a) 4:1 hexano-acetato de etilo, b) 1:4 hexano-acetato de etilo, c) 1:1 hexano-acetato de etilo y d) solo acetato de etilo.

#### 4.1.4 Pruebas fitoquímicas

Los resultados de los extractos obtenidos tanto del hongo chino como del nacional se registraron como abundante (+++), moderado (++) , escaso (+) y nulo (-) (Domínguez, 1983) y se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 4.1** Resultado de las pruebas fitoquímicas a los extractos de *Ganoderma lucidum* chino y nacional

Extracto	Alcaloides		Saponinas	Flavonoides	Glucósidos	Triterpenos
	Wagner	Mayer				
<i>Ganoderma lucidum</i> chino + diclorometano	+++	-	-	+++	+++	-
<i>Ganoderma lucidum</i> nacional + diclorometano	+++	+++	-	-	++	+++
<i>Ganoderma lucidum</i> nacional + metanol	+++	+	-	-	+++	++
<i>Ganoderma lucidum</i> chino + tequila	-	-	-	-	-	-
<i>Ganoderma lucidum</i> chino + mezcal	+++	+++	-	-	-	-

Se considera una prueba positiva para alcaloides con los reactivos de Wagner y Mayer con la aparición de un precipitado.



Figura 4.10 Prueba positiva para alcaloides con los reactivos de a) Wagner y b) Mayer

Se considera una prueba positiva para flavonoides con el reactivo de Shinoda con cambio de color del rojo al magenta.



Figura 4.11 Prueba positiva para flavonoides.

Se considera una prueba positiva para glucósidos con el reactivo de Baljet con cambio de coloración a naranja o roja.



Figura 4.12 Prueba positiva para glucósidos

Se considera una prueba positiva para triterpenos con el cambio de coloración roja, rosa, verde, purpura o azul.



Figura 4.13 Prueba positiva para triterpenos.

Así mismo se comparó con lo expuesto por varios autores, encontrando que los metabolitos más reportados son los glucósidos y los triterpenos los cuales encontramos en las muestras de *Ganoderma lucidum* chino y nacional en diclorometano.

Tabla 4.2 Metaanálisis

	Wagner (alcaloides)	Mayer	Saponinas	Shinoda (flavonoides)	Baljet (glucósidos)	Triterpenos	Beneficio a la salud
Gl chino + diclorometano	Ok	X	X	X	OK		
Gl nacional + diclorometano	X	X	X	X	X		
Gl nacional + etanol	OK	X	OK	OK	X		
Titin Andri Wihastuti et al 2017					<i>β-D-glucano</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioxidante</li> <li>• Aumenta las citocinas antiinflamatorias</li> <li>• Aumenta el número de EPC</li> <li>• Disminuye el grosor de la intima-media de la aorta</li> </ul>
Ulrike Grienke, et al. 2011						Ganoderma lanostano	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectos antiinflamatorios</li> <li>• Efectos inductores de FXR</li> </ul>
Wei-Ling Guo 2018						12 ácidos ganodericos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se redujeron los niveles de TG, TC y LDL-C y la tolerancia a la glucosa</li> <li>• Cambió significativamente la abundancia relativa de la microbiota intestinal</li> </ul>
María E. Meneses, et al. 2016					Glucanos	26-oxigenoteroles de ganoderol, ganoderal y ácido ganoderico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulador de diferentes mecanismos asociados al metabolismo del colesterol</li> </ul>
Miao Hu et al 2014					Formula multitherbal		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de LDL-C</li> </ul>
Tanya T. W. Chu et, al 2011					Adenosina	ácido ganoderico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de LDL-C después de 4 semanas de tratamiento</li> </ul>
Anita Thyagarajan-Sahu 2011					13.5% polisacáridos	6% triterpenos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibidor de la diferenciación de adipocitos a través de la supresión de la expresión de la transcripción adipogénica</li> <li>• Puede usarse como agente natural para controlar obesidad y la diabetes tipo 2</li> </ul>

### 4.1.5 Espectros de infrarrojo

A continuación, se muestran los espectros TF-IR de los extractos de *Ganoderma lucidum* nacional y chino con los diferentes solventes utilizados:

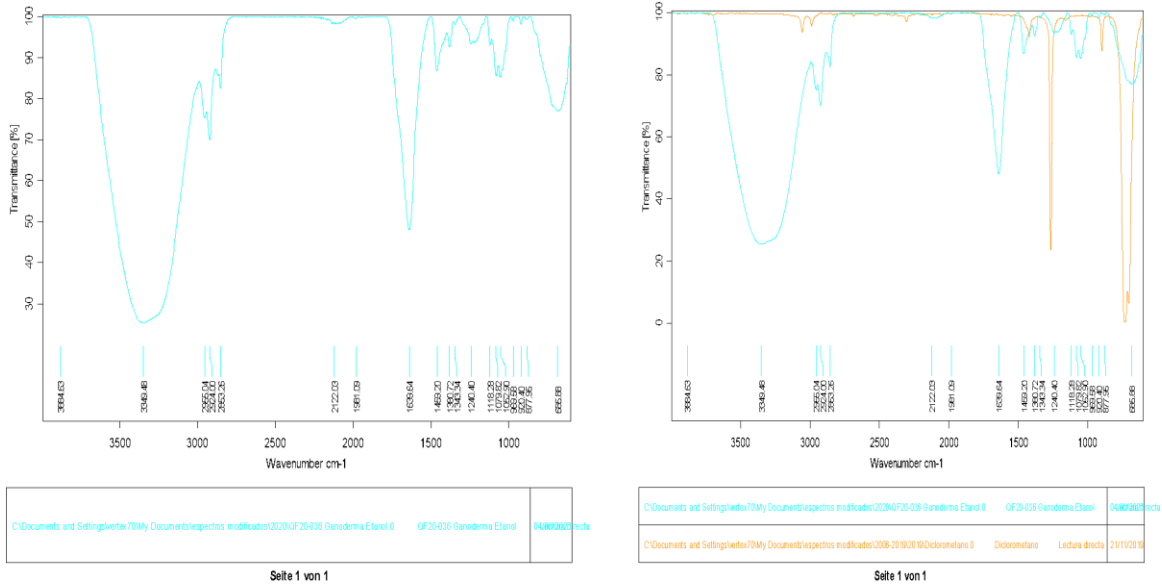


Figura 4.14 Extracto de *Ganoderma lucidum* nacional con metanol.

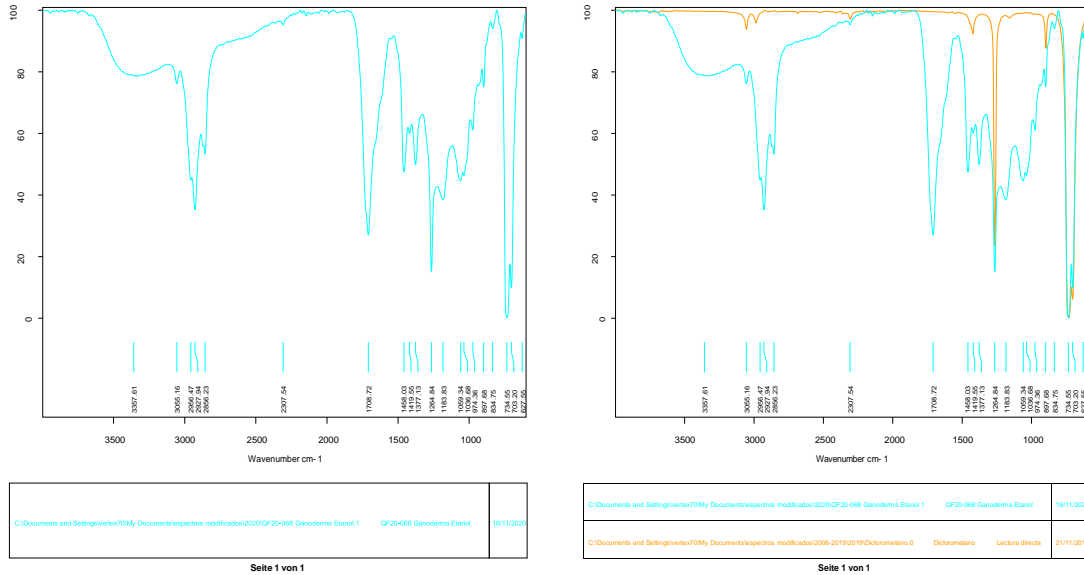
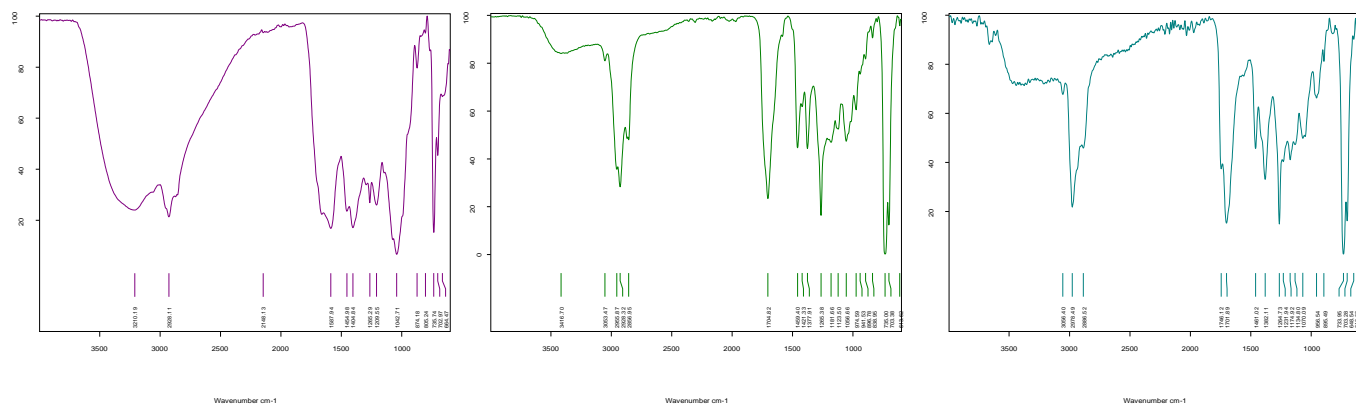


Figura 4.15 Extracto de *Ganoderma lucidum* chino con metanol.



C:\Documents and Settings\ivansa70\My Documents\espectros modificados\2021\GF2-469 Ganoderma nacional metanol.1 GF2-469 Ganoderma 14072021

Seite 1 von 1

C:\Documents and Settings\ivansa70\My Documents\espectros modificados\2021\GF2-5170 Ganoderma nacional diclorometano.0 GF2-470 Ganoderma 14072021

Seite 1 von 1

C:\Documents and Settings\ivansa70\My Documents\espectros modificados\2021\GF2-471 Ganoderma nacional agua.0 GF2-471 Ganoderma n 14072021

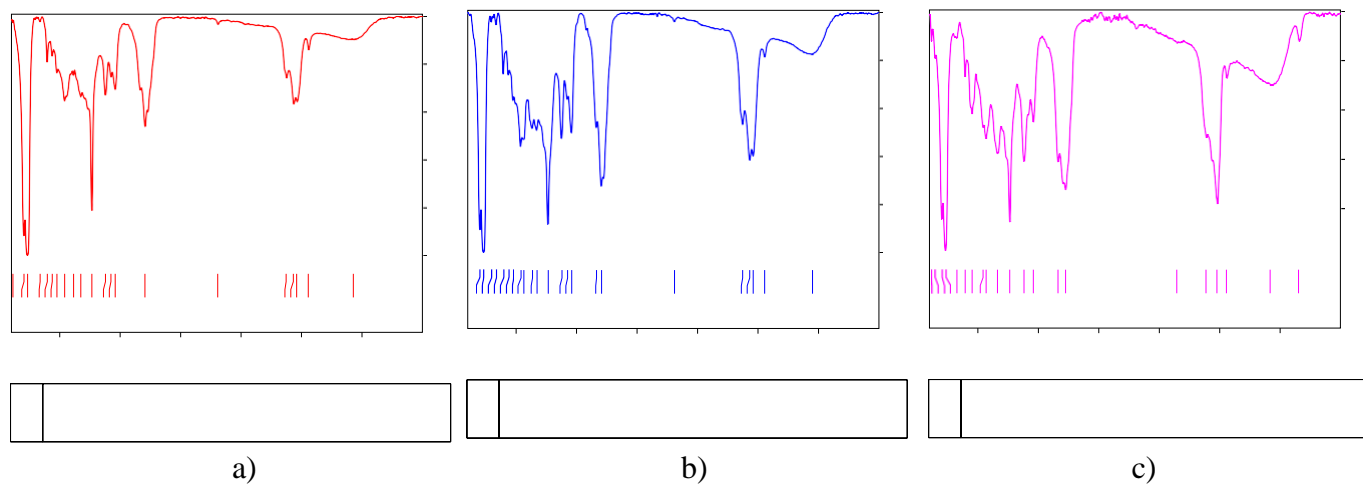
Seite 1 von 1

a)

b)

c)

Figura 4.16 Extracto de *Ganoderma lucidum* nacional con a) metanol, b) diclorometano y c) agua.

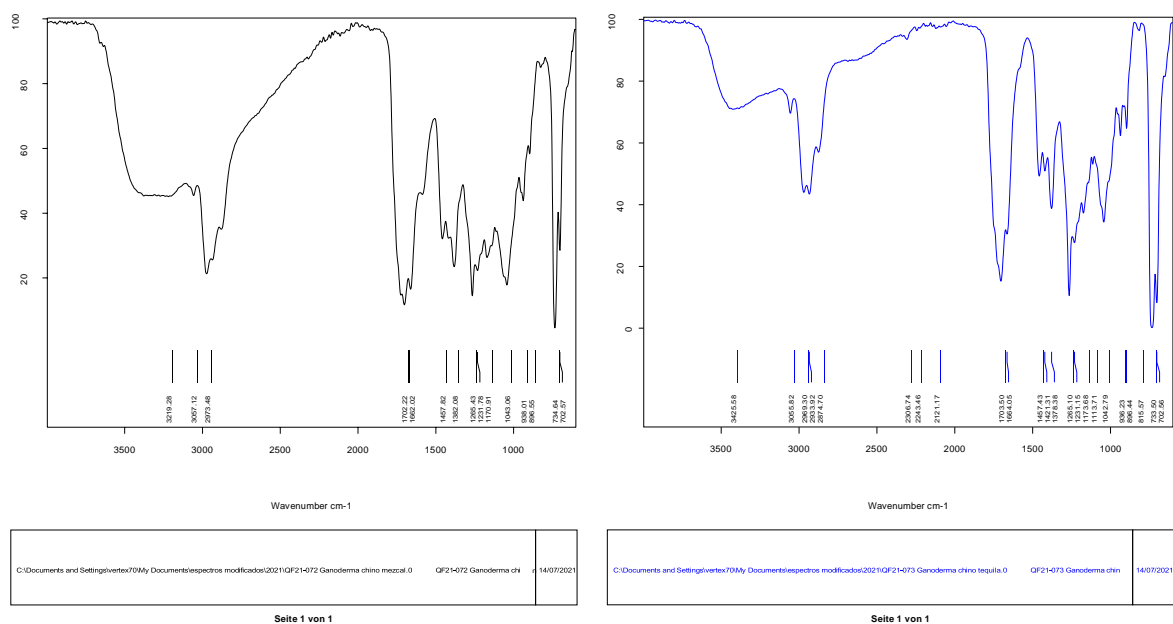


a)

b)

c)

Figura 4.17 Extracto de *Ganoderma lucidum* chino con a) metanol, b) diclorometano y c) agua.



a)

b)

Figura 4.18 Extracto de *Ganoderma lucidum* chino con a) mezcal y b) tequila.

#### 4.1.6 Pruebas de Kirby Bauer

Los resultados de las pruebas microbiológicas por la técnica de Kirby Bauer se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.3 Efecto antimicrobiano de los extractos de *Ganoderma lucidum* chino y nacional sobre *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Microorganismo	Extractos de <i>Ganoderma lucidum</i>			
	Chino con diclorometano	Chino con metanol	Nacional con diclorometano	Nacional con metanol
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 682444	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 68110F	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	-	+

*Escherichia coli* 0682380

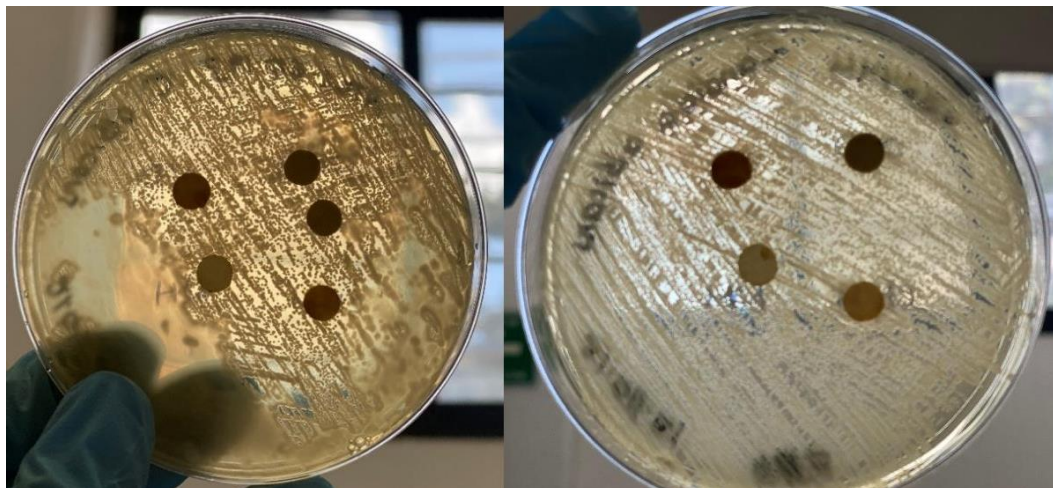
+

+

-

+

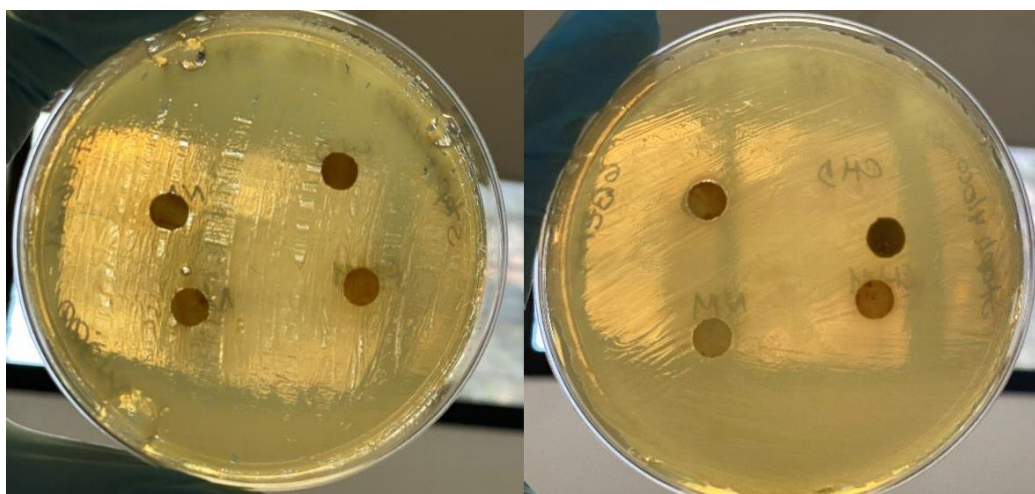
+ Con halo de inhibición, - Sin halo de inhibición



a)

b)

Figura 4.19 Antibiogramas: a) *Candida albicans* ATCC 60193 y b) *Candida albicans* 682444



a)

b)

Figura 4.20 Antibiogramas a) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y b) *Staphylococcus aureus* 68110F

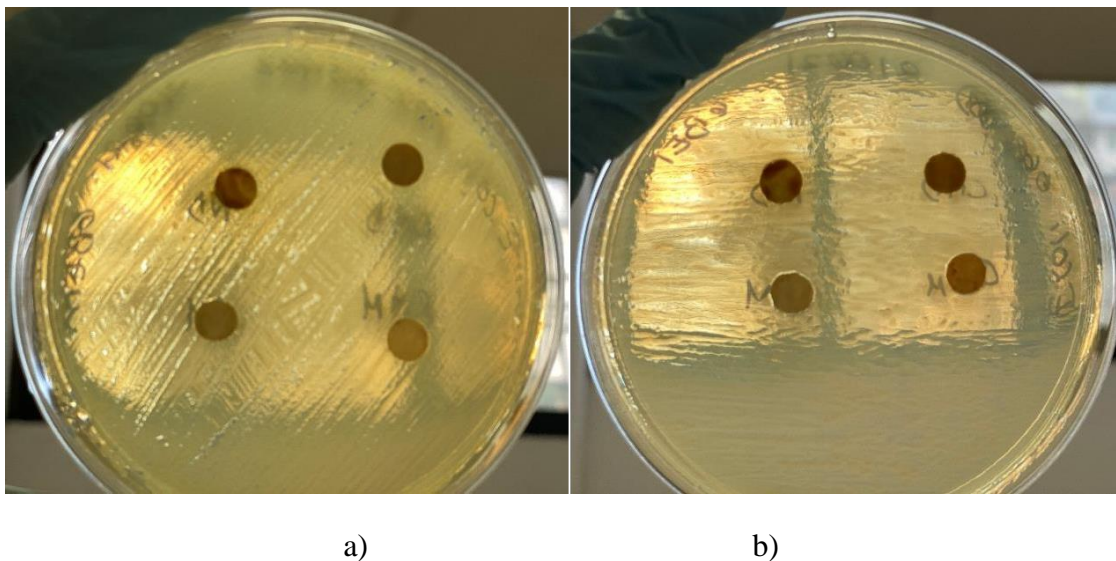


Figura 4.21 Antibiograma : a) *Escherichia coli* ATCC 25922 y b) *Escherichia coli* 0682380

Se observaron halos de inhibición aproximadamente de 6 mm en las placas de los extractos de *Ganoderma lucidum* nacional con diclorometano para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, el mismo extracto, pero en metanol presento inhibición para *Staphylococcus aureus* 68110F, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* 0682380.

El extracto chino con diclorometano y metanol presento halos de inhibición para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* 0682380.

#### 4.1.7 Pruebas de microdilución (CMI<sub>50</sub>)

Los resultados de las pruebas por microdilución se muestran a continuación:

Tabla 4.4 Efecto antimicrobiano del extracto metanólico de *Ganoderma lucidum* nacional sobre *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )/OD	<i>Staphylococcus aureus</i> 68110F	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> 0682380	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> 682444	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193

0	0.303	0.332	0.534	0.290	0.204	0.132
0.448	0.568	0.232	1.061	0.479	0.111	0.230
4.48	0.421	0.164	0.686	0.645	0.338	0.412
44.8	0.444	0.213	0.715	0.573	0.257	0.205
448	0.492	0.311	0.836	0.578	0.422	0.310

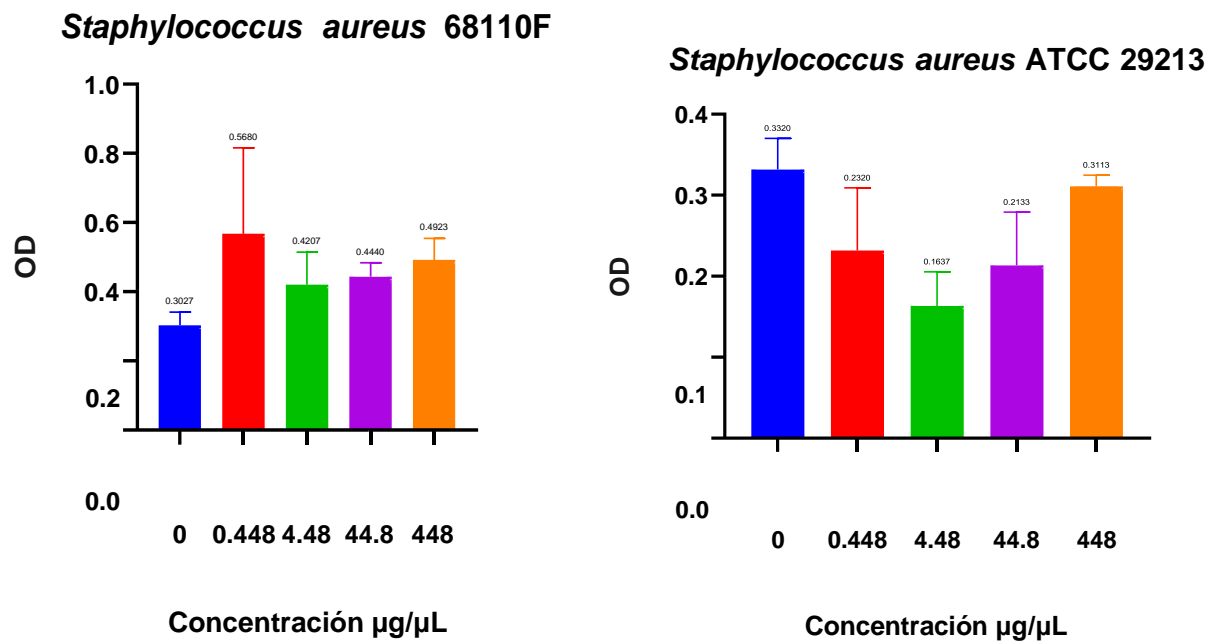


Figura 4.22 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto metanólico de *Ganoderma lucidum* nacional a las cepas *Staphylococcus aureus* de aislamiento clínico y ATCC.

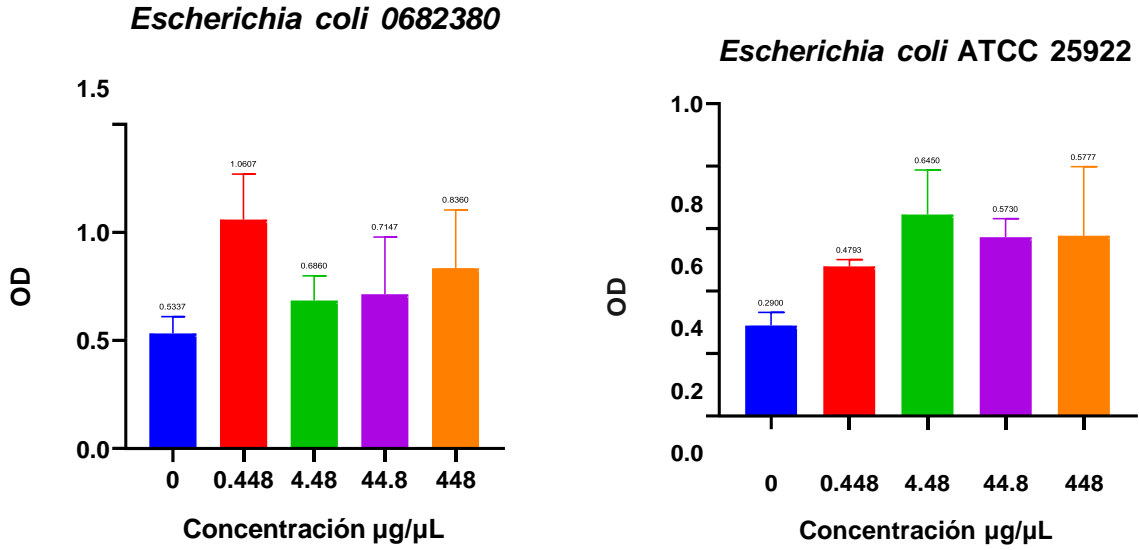


Figura 4.23 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto metanólico de *Ganoderma lucidum* nacional a las cepas *Escherichia coli* de aislamiento clínico y ATCC.

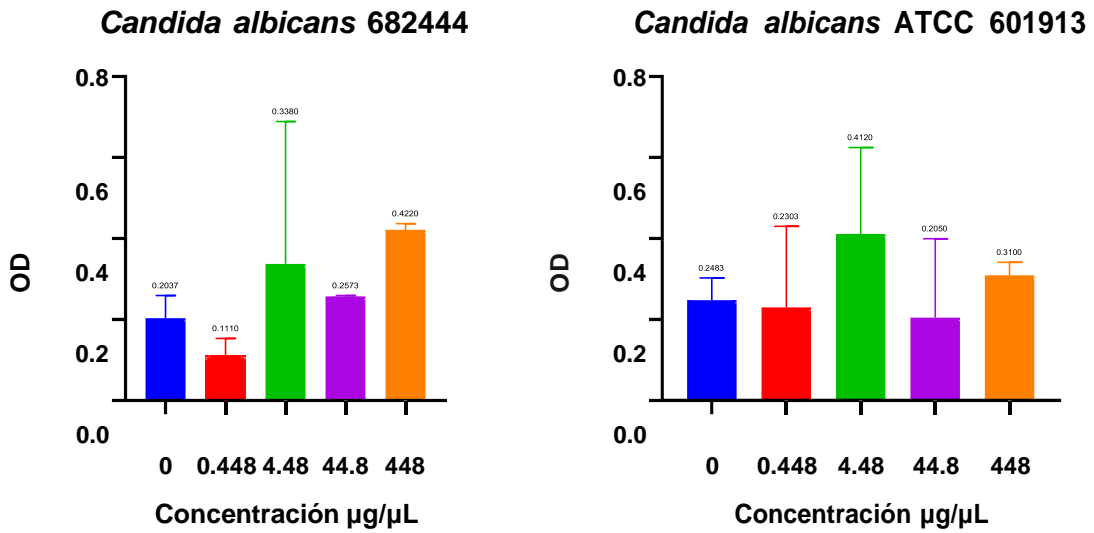


Figura 4.24 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto metanólico de *Ganoderma lucidum* nacional a las cepas *Candida albicans* de aislamiento clínico y ATCC.

Tabla 4.5 Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de *Ganoderma lucidum* nacional sobre *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Concentración (µg/µL)/OD	<i>Staphylococcus aureus</i> 68110F	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> 0682380	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> 682444	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193
0	0*	0.471	0.662	0.294	0.111	0.264
0.448	0.463	0.181	0.938	0.292	0.323	0.629
4.48	0.390	0.234	0.625	0.013	0.308	0.708
44.8	0.832	0.638	0.701	0.019	0.027	0.777
448	0.345	0.155	0.546	0.202	0.391	0.256

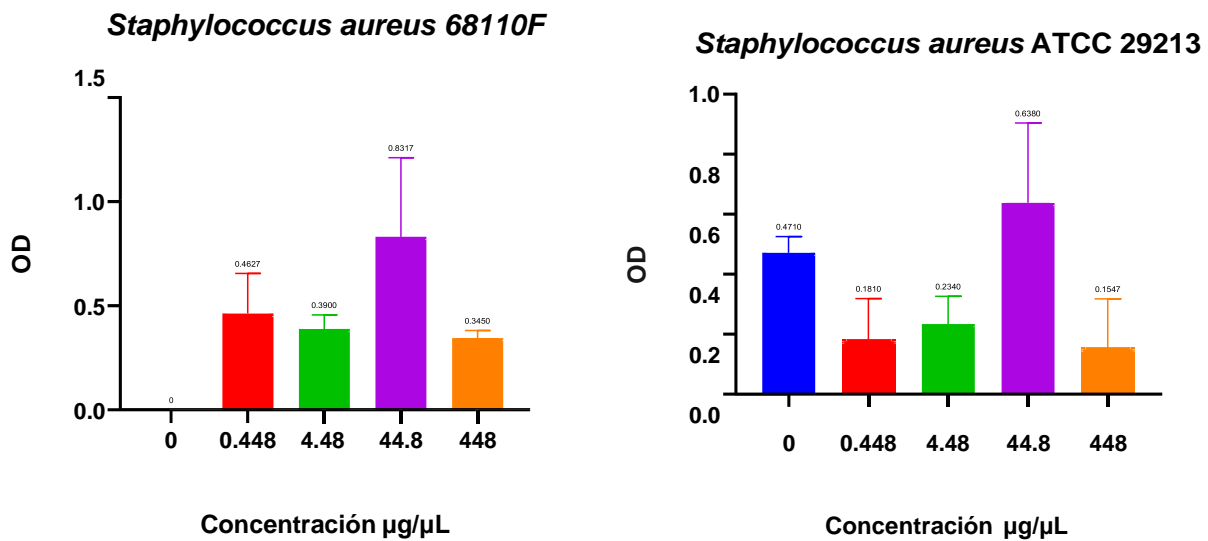


Figura 4.25 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto acuoso de *Ganoderma lucidum* nacional a las cepas *Staphylococcus aureus* de aislamiento clínico y ATCC.

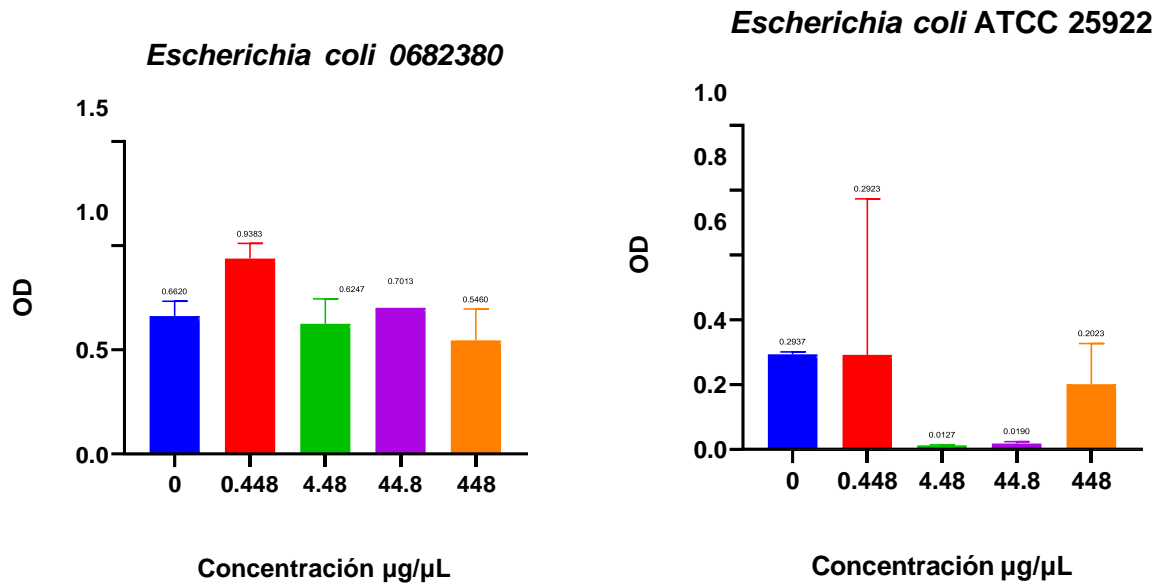


Figura 4.26 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto acuoso de *Ganoderma lucidum* nacional a las cepas *Escherichia coli* de aislamiento clínico y ATCC.

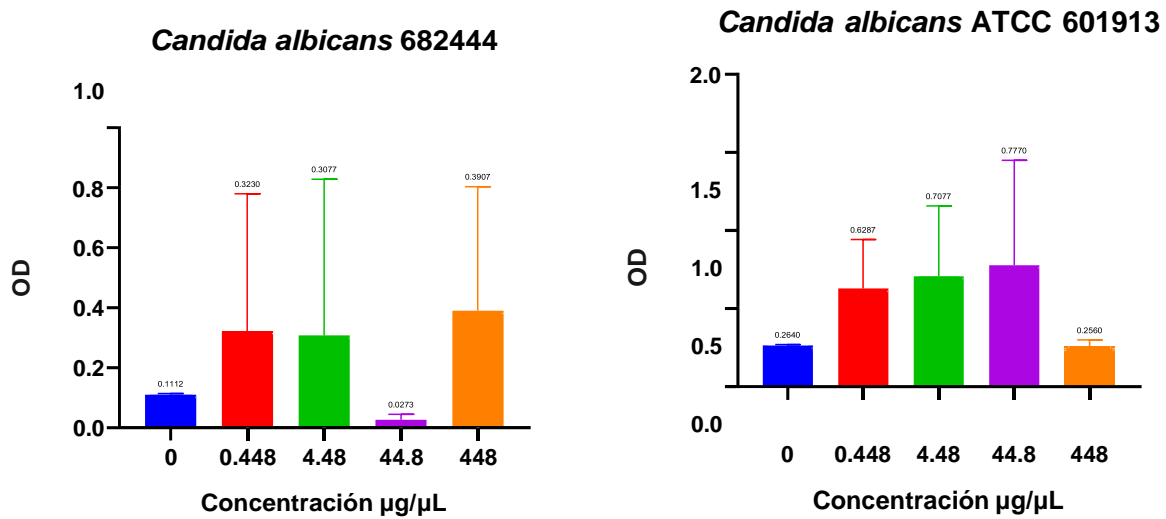


Figura 4.27 Prueba de concentración mínima inhibitoria con el extracto acuoso de *Ganoderma lucidum* nacional a las cepas *Candida albicans* de aislamiento clínico y ATCC.

## 4.2 DISCUSIÓN

Las pruebas fitoquímicas arrojaron presencia de metabolitos bioactivos para cada uno de los extractos utilizando diferentes solventes, estas pruebas cualitativas fueron comprobadas con los espectros infrarrojos en los que se encontró presencia de un glucósido cardiotónico para el extracto metanólico nacional y un flavonoide para el extracto metanólico chino.

Para el espectro infrarrojo del *Ganoderma lucidum* nacional con metanol la banda que aparece alrededor de  $3349.48\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al enlace O-H, la banda de  $2924\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de un alcano, en la banda de  $1639.64\text{ cm}^{-1}$  a un enlace de tensión del grupo carbonilo, en la banda entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  se encuentra en enlace del C-O-C y finalmente en la banda entre  $1118\text{ cm}^{-1}$  y  $1079\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace  $\beta$  del O-H del pirano todas estas características son de un glucósido cardiotónico comparado con lo reportado por (Y. Liu et al., 2021) y (Choong et al., 2014) ya que ambos en sus investigaciones detectaron bandas con características similares a los que se reportaron en este trabajo, ambos encontraron bandas ubicadas entre  $3383\text{ cm}^{-1}$  y  $2889\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a vibraciones de estiramiento de enlaces O-H y C-H respectivamente, una banda en  $1640\text{ cm}^{-1}$  que es característica de los polisacáridos, una banda en la región de  $1074\text{ cm}^{-1}$  y  $1046\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un monosacárido de hexopiranososa y por último la banda en  $896\text{ cm}^{-1}$  de la configuración  $\beta$  en el polisacárido por lo que se llegó a esta conclusión, en un principio se consideró que podrían corresponder a un triterpeno sin embargo se descartó esto ya que no aparecen las bandas aproximadamente entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$  que son representativas de este metabolito.

Para el espectro infrarrojo del *Ganoderma lucidum* chino con metanol la banda que aparece alrededor de  $3357\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace O-H probablemente del anillo aromático, la banda de  $2900\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los enlaces C-H aromáticos o de los  $\text{CH}_3$ , la banda que se encuentra

en  $1708\text{ cm}^{-1}$  corresponde al doble enlace C=O, la banda de  $1558\text{ cm}^{-1}$  a  $1419\text{ cm}^{-1}$  al enlace C=C y en la banda entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$  el enlace C-O-C por lo que existe la presencia de un flavonoide comparado con lo reportado en la bibliografía por (Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, 2015) debido a que las bandas de este espectro IR ofrece información de los agrupamientos funcionales que se encontraron con las características de este metabolito, los flavonoides son considerados principalmente como agentes antioxidantes por lo que presentan propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y como reductores del colesterol entre otras,. También (Domínguez, 1973) reporta que estos grupos son característicos de los flavonoides ya que las bandas que se encuentran entre  $3300\text{ cm}^{-1}$  y  $3140\text{ cm}^{-1}$  pertenece a los hidroxilos fenólicos y la banda de  $1660\text{ cm}^{-1}$  al grupo carbonilo.

Para el análisis antimicrobiano con la técnica de Kirby Bauer presentaron halos de inhibición para el extracto nacional con diclorometano y metanol las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ambas de aislamiento clínico y ATCC y para el extracto chino con diclorometano y metanol únicamente presentaron inhibición las cepas de *Escherichia coli* ambas de aislamiento clínico y ATCC.

En su reporte (Karwa, A. S., & Rai, 2012) evaluó la actividad antibacteriana con los extractos etanolicos y acuosos del cuerpo fructífero por el método de difusión de disco contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en este estudio se observó que el extracto acuoso inhibía el crecimiento patógeno, también se encontró que la combinación de este extracto con discos de antibióticos sintéticos aumentan la actividad antimicrobiana más que los antibióticos solos.

(Vazirian et al., 2014) utilizo fracciones purificadas y semipurificadas de los extractos con hexano y cloroformo del cuerpo fructifero del *Ganoderma lucidum* utilizando también la técnica de

difusión en disco frente a dos cepas Gram positivas: *S. aureus* ATCC y *B. subtilis* ATCC, dos Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC y *Escherichia coli* ATCC y una levadura *Candida albicans* ATCC. Las fracciones se disolvieron en cloroformo a una concentración de 3.125 mg/mL y 1.25 mg/mL cada una, se utilizó este disolvente ya que es miscible en la mayoría de los compuestos orgánicos y se evapora muy rápido. La bacteria y la levadura se incubaron a 37°C por 24 horas y a 20-25°C por 48 horas respectivamente. El ensayo arrojó inhibición frente a las bacterias Gram positivas y la levadura a una concentración de 6.25 mg/mL ya que los halos de inhibición eran mayores a 30 mm, pero no así para las Gram negativas ya que para lograr este efecto inhibitorio se tuvo que aumentar la concentración a 10 mg/mL.

Sin embargo, en nuestro ensayo, para el análisis en las pruebas de microdilución no se observó lo mismo debido a las inconsistencias en los valores reportados ya que se obtuvieron valores de concentración que inhibía el crecimiento microbiano pero al aumentar esta concentración lo que reflejaba no era una disminución sino un aumento de la bacteria actuando como fuente de carbono. Para el extracto nacional de *Ganoderma lucidum* con metanol en la cepa de *Staphylococcus aureus* 681107 no se observó disminución de la OD con el incremento de concentración. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 todas las concentraciones propuestas para el experimento tuvieron menor lectura de OD que la muestra que no tenía el extracto, sin embargo, la concentración que mejor resultado tuvo fue la de 4.48 µg/µL al presentar la OD más baja (0.164). Para *Escherichia coli* 0682380 y *Escherichia coli* ATCC 25922 no se obtuvieron resultados satisfactorios en ninguna concentración, es decir ninguna lectura de OD fue más baja que la de la muestra del control negativo. Para *Candida albicans* 682444 solo la concentración más baja (0.448 µg/µL) obtuvo una lectura menor a la de la muestra sin el extracto, las demás concentraciones presentaron un aumento en la lectura de OD. Para *Candida albicans* ATCC 60193 ninguna

concentración tuvo resultados satisfactorios.

Para el extracto acuoso de *Ganoderma lucidum* nacional la cepa de *Staphylococcus aureus* 68110F no arrojó resultados favorables, sin embargo, para la misma cepa, pero ATCC 29213 las concentraciones de 0.448, 4.48 y 448  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  dieron un valor más bajo de OD que la muestra que solo contenía la cepa, la concentración más alta (448  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) arrojó un valor de OD de 0.155.

El mismo extracto acuoso, pero para *Escherichia coli* 0682380 tuvo buen comportamiento en la concentración máxima de 448  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con un valor de OD de 0.546, para *Escherichia coli* ATCC 25922 las concentraciones de 4.48 y 44.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  tuvieron el mejor resultado en la disminución de OD con 0.013 y 0.019 respectivamente. Para la cepa de *Candida albicans* 682444 el mejor resultado de disminución de OD fue para la concentración de 44.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y para *Candida albicans* ATCC 60193 la concentración de 448  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  fue la que presentó menor OD, pero por muy poco con respecto a la muestra que solo contenía la cepa.

Vale la pena resaltar que los cambios en la OD para ambos extractos tanto metanólico como acuoso no fueron consistentes, es decir, en algunos casos la lectura de OD variaba si se aumentaba la concentración, se esperaba una disminución si se aumenta la concentración sin embargo este no fue el caso.

El ácido ganodérico es una clase de triterpeno que tienen la actividad antimicrobiana ya que ataca la pared antibacteriana, (Taofiq et al., 2016) utilizó el método colorimétrico para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico frente a bacterias Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* aislada de expectoración y *Staphylococcus aureus* proveniente de exudado de heridas, también utilizó bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Escherichia coli* BLEE, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* BLEE, *Morganella morganii* y *Proteus mirabilis*, en el cual el extracto etanólico fue

disuelto en DMSO al 25% a 50 mg/ml, en el inicio del análisis se agregaron 100 mL del extracto a 380 mL de medio de cultivo, sin embargo posteriormente se adicionaron 20 mL del inóculo para obtener una concentración de 10 a 0.156 mg/mL, los resultados observados en este estudio arrojaron inhibición tanto en las bacterias Gram negativas como las Gram positivas

Se ha reportado que los ácidos fenólicos que se encuentran presentes en *Ganoderma lucidum* y se han identificado como los contribuyentes principales a la actividad antimicrobiana.

En el reporte de (Shang, X., Tan, Q., Liu, R., Yu, K., Li, P., & Zhao, 2013) comenta que el extracto con etanol a partir del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* inhibió a *Staphylococcus aureus* ATCC a una concentración de 10 mg/mL sin embargo no tuvo efecto frente a dos cepas de *Escherichia coli*.

Finalmente (Yoon et al., 1994) utilizó bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* entre otras para analizar el efecto antimicrobiano, aplicando el extracto acuoso del carpóforo de *Ganoderma lucidum* y en combinación con otros antibióticos para determinar la CMI mediante el método de dilución. El resultado mostró inhibición a diferentes concentraciones del extracto sin embargo el mejor efecto se observó más en bacterias Gram positivas que en Gram negativas, los resultados de la combinación del extracto con antibióticos también presentaron un efecto coadyuvante, pero la mejor sinergia se observó al combinar el extracto con cefazolina. Para nuestro ensayo el extracto con el hongo nacional con diclorometano y metanol presentó buena inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* de aislamiento clínico y ATCC respectivamente.

## CONCLUSION

De este trabajo de investigación se puede concluir lo siguiente:

Se observan diferencias en la composición química de los metabolitos del hongo de *Ganoderma lucidum* chino y nacional en las pruebas fitoquímicas.

Los espectros IR comprueban que los resultados de las pruebas fitoquímicas corresponden a las estructuras base de los grupos funcionales detectados en las bandas.

En la extracción del hongo de *Ganoderma lucidum* en tequila y mezcal se observó presencia de metabolitos bioactivos en las placas cromatográficas y en los espectros IR, se observó en el primer experimento que con el paso del tiempo (10 meses aproximadamente) estos metabolitos tienden a ser inestables en las condiciones en que se almacenaron por lo que se sugiere realizar análisis de estabilidad.

Se observa actividad antimicrobiana positiva para el extracto nacional con diclorometano para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, para el extracto nacional metanólico el halo de inhibición se presentó en *Staphylococcus aureus* de aislamiento clínico 68110F, *Escherichia coli* ATCC 25922 y aislamiento clínico 0682380. Para el extracto chino con diclorometano y metanol las cepas que presentaron halo de inhibición fueron únicamente *Escherichia coli* ATCC 25922 y aislamiento clínico 0682380.

Los resultados observados en este ensayo de las pruebas de concentración mínima inhibitoria mostraron que ocurre una variación de las concentraciones contra el crecimiento bacteriano, la concentración más alta no es la que dio el mejor resultado en todos los casos, por lo tanto, el comportamiento no es lineal. Se concluye que en este estudio funciono como fuente de carbono y no como inhibidor en ciertas concentraciones a pesar de seguir la misma estrategia reportada no se obtuvieron los mismo resultados, sin embargo en investigaciones posteriores se recomienda

corroborar con un aumento en las concentraciones ya que la bibliografía nos indica que es posible inhibir este crecimiento como lo afirman en sus artículos (Vazirian et al., 2014), (Yoon et al., 1994) y (Karwa, A. S., & Rai, 2012).

## BIBLIOGRAFÍA

- Adamu, I. I., & Sakuma, M. (2012). *Proximate Composition , Phytochemical and Elemental Analysis of Some Organic Solvent Extract of The Wild Mushroom- Ganoderma*. 2(4), 24–36.
- Ahmad, M. F. (2018). Ganoderma lucidum: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(August), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.036>
- Baby, S., Johnson, A. J., & Govindan, B. (2015). Secondary metabolites from Ganoderma. *Phytochemistry*, 114, 66–101. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>
- Bao, X. F., Wang, X. S., Dong, Q., Fang, J. N., & Li, X. Y. (2002). Structural features of immunologically active polysaccharides from Ganoderma lucidum. *Phytochemistry*, 59(2), 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00450-2)
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., & Zhi-Bin, L. (2007). Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 13, Issue 07). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13010-6](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13010-6)
- Guo, W. L., Pan, Y. Y., Li, L., Li, T. T., Liu, B., & Lv, X. C. (2018). Ethanol extract of Ganoderma lucidum ameliorates lipid metabolic disorders and modulates the gut microbiota composition in high-fat diet fed rats. *Food and Function*, 9(6), 3419–3431. <https://doi.org/10.1039/c8fo00836a>
- Hennicke, F., Cheikh-Ali, Z., Liebisch, T., MacIá-Vicente, J. G., Bode, H. B., & Piepenbring, M. (2016). Distinguishing commercially grown Ganoderma lucidum from Ganoderma lingzhi from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic

- acid profiles. *Phytochemistry*, 127, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.03.012>
- Joseph, S., Sabulal, B., George, V., Smina, T. P., & Janardhanan, K. K. (2009). Antioxidative and antiinflammatory activities of the chloroform extract of *Ganoderma Lucidum* found in South India. *Scientia Pharmaceutica*, 77(1), 111–121. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0808-17>
- Keypour, S., Rafati, H., Riahi, H., Mirzajani, F., & Moradali, M. F. (2010). Qualitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chemistry*, 119(4), 1704–1708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.058>
- Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., & Tsunoo, H. (1989). Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 472–478. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31282-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31282-6)
- Liu, Y., Zhang, J., Tang, Q., Yang, Y., Guo, Q., Wang, Q., Wu, D., & Cui, S. W. (2014). Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive  $\beta$ -d-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 968–974. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.024>
- Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, M. C. F. (2015). *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides*.
- Paterson, R. R. M. (2006). *Ganoderma - A therapeutic fungal biofactory*. *Phytochemistry*, 67(18), 1985–2001. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.004>
- Platelet, A. (1993). *S-deoxy-s-methylsulphinyladenosine, a platelet tioninhibitorfrom*. 32(2), 239–241.

- Ríos-Cañavate, J. L. (2008). *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades inmunoestimulantes. *Rev. Fitoter*, 135–146.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., Verde-Star, M. J., Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. In *Investigación en plantas de importancia médica* (Issue May 2017). <https://doi.org/10.3926/oms.315>
- Rojas, L. C., Uribe, Y. H., Sierra M, N., & Rueda N, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana*). *Revista Colombia Forestal*, 12, 161–170.
- Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Iotti, M., Zambonelli, A., Buffalini, M., Casadei, L., Vallorani, L., & Stocchi, V. (2009). Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry*, 116(1), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.023>
- Sharma, C., Bhardwaj, N., Sharma, A., Tuli, H. S., Batra, P., Beniwal, V., Gupta, G. K., & Sharma, A. K. (2019). Bioactive metabolites of *Ganoderma lucidum*: Factors, mechanism and broad spectrum therapeutic potential. *Journal of Herbal Medicine*, 17–18(October 2017), 100268. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100268>
- Sohretoglu, D., & Huang, S. (2018). *Ganoderma lucidum* Polysaccharides as An Anti-cancer Agent. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18(5), 667–674. <https://doi.org/10.2174/1871520617666171113121246>
- Thu, Z. M., Ko Myo, K., Aung, H. T., Clericuzio, M., Armijos, C., & Vidari, G. (2020). Bioactive phytochemical constituents of wild edible mushrooms from Southeast Asia. *Molecules*, 25(8). <https://doi.org/10.3390/molecules25081972>

- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3–4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Choong, Y. K., Sun, S. Q., Zhou, Q., Lan, J., Lee, H. L., & Chen, X. D. (2014). Verification of Ganoderma (lingzhi) commercial products by Fourier Transform infrared spectroscopy and two-dimensional IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 1069(1), 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.049>
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica* (C. R. de A. Técnica (ed.)). Limusa.
- Gao, Y., Zhou, S., Huang, M., & Xu, A. (2003). Antibacterial and Antiviral Value of the Genus Ganoderma P. Karst. Species (Aphyllorphoromycetidae): A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5(3), 12.
- Hennicke, F., Cheikh-Ali, Z., Liebisch, T., MacIá-Vicente, J. G., Bode, H. B., & Piepenbring, M. (2016). Distinguishing commercially grown Ganoderma lucidum from Ganoderma lingzhi from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. *Phytochemistry*, 127, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.03.012>
- Karwa, A. S., & Rai, M. K. (2012). Naturally occurring medicinal mushroom-derived antimicrobials: a case-study using Lingzhi or Reishi Ganoderma lucidum (W. Curt.:Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(5), 481–490. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v14.i5.60>
- Keypour, S., Rafati, H., Riahi, H., Mirzajani, F., & Moradali, M. F. (2010). Qualitative analysis of ganoderic acids in Ganoderma lucidum from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chemistry*, 119(4), 1704–1708.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.058>

Liu, D. Z., Zhu, Y. Q., Li, X. F., Shan, W. G., & Gao, P. F. (2014). New triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and their bioactivities. *Chemistry and Biodiversity*, *11*(6), 982–986. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400004>

Liu, Y., Wang, Y., Zhou, S., Yan, M., Tang, Q., & Zhang, J. (2021). Structure and chain conformation of bioactive  $\beta$ -D-glucan purified from water extracts of *Ganoderma lucidum* unbroken spores. *International Journal of Biological Macromolecules*, *180*, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.003>

Meneses, M. E., Martínez-Carrera, D., Torres, N., Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Morales, P., Sobal, M., Bernabé, T., Escudero, H., Granados-Portillo, O., & Tovar, A. R. (2016). Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL\_6 Mice \_ Enhanced Reader.pdf. *PLoS ONE*, *11*(7).

Ochoa, L., & Sarmiento, A. (2018). ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE VEGETAL *Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC. (Melastomataceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA. *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*, *83*. [https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/996/1/TESIS 2018-05-22.pdf](https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/996/1/TESIS%202018-05-22.pdf)

Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, M. C. F. (2015). *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides*.

Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., Verde-Star, M. J., Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. In *Investigación en plantas de importancia médica* (Issue May 2017). <https://doi.org/10.3926/oms.315>

- Shang, X., Tan, Q., Liu, R., Yu, K., Li, P., & Zhao, G. P. (2013). In vitro anti-Helicobacter pylori effects of medicinal mushroom extracts, with special emphasis on the Lion's Mane mushroom, *Hericium erinaceus* (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *15*(2), 165–174.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v15.i2.50>
- Siwulski, M., Sobieralski, K., Golak-Siwulska, I., Sokół, S., & Sękara, A. (2015). *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. – health-promoting properties. A review. *Herba Polonica*, *61*(3), 105–118. <https://doi.org/10.1515/hepo-2015-0026>
- Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Barreiro, M. F., González-Paramás, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Development of Mushroom-Based cosmeceutical formulations with Anti-Inflammatory, Anti-Tyrosinase, antioxidant, and antibacterial properties. In *Molecules* (Vol. 21, Issue 10).  
<https://doi.org/10.3390/molecules21101372>
- Vazirian, M., Faramarzi, M. A., Ebrahimi, S. E. S., Esfahani, H. R. M., Samadi, N., Hosseini, S. A., Asghari, A., Manayi, A., Mousazadeh, A., Asef, M. R., Habibi, E., & Amanzadeh, Y. (2014). Antimicrobial effect of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) and its main compounds. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *16*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v16.i1.70>
- Yoon, S. Y., Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., & Han, S. S. (1994). Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Archives of Pharmacal Research*, *17*(6), 438–442. <https://doi.org/10.1007/BF02979122>

## **ANEXO**