

EVALUACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL HONGO *Ganoderma lucidum* CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA FRENTE A *Fusarium* spp. DE INTERES CLINICO



FABIAN CAMILO NIÑO ARIAS

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

BIOLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGIA

Bogotá D.C.

Mayo 24, 2010.

EVALUACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL HONGO *Ganoderma lucidum* CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA FRENTE A *Fusarium* spp. DE INTERES CLINICO



FABIAN CAMILO NIÑO ARIAS

APROBADO

INGRID SCHULLER Ph. D.
DECANA ACADEMICA

ANDREA FORERO
DIRECTORA CARRERA

EVALUACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL HONGO *Ganoderma lucidum* CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA FRENTE A *Fusarium* spp. DE INTERES CLINICO



FABIAN CAMILO NIÑO ARIAS

APROBADO

JORGE ELIECER ROBLES Ph. D.
DIRECTOR

MARIA XIMENA RODRIGUEZ Ph, D
CODIRECTORA

LUIS DAVID GOMEZ M.Sc.
JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera, y darme la sabiduría y empuje durante todo el desarrollo de este trabajo de grado.

A mis padres, Luis Miguel Niño y Ana Isabel Arias; hermanos Miguel, Nana y Natalia por haber confiado, apoyado y acompañado en todos los momentos de mi carrera, trabajo de grado y sobre todo de mi vida.

A mi tía Ligia por su apoyo incondicional durante mi carrera, porque sin su gran ayuda no hubiera sido posible este logro.

A María Ximena Rodríguez y Jorge Robles por su paciencia, confianza, enseñanza y apoyo durante todo el proceso y desarrollo de este trabajo.

A mis amigos Andrés, Maka, Ximena, Karol y Ángela por su compañía, comprensión, paciencia y apoyo durante todo el proceso.

A mis compañeros de los laboratorios de investigación en química y UNIDIA por su compañía y apoyo, los cuales hicieron que este trabajo fuera agradable en los momentos que parecían ser los más difíciles.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron parte de la elaboración de este trabajo de grado y no se encuentran en estas líneas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCION.....	8
2. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.....	9
3. MARCO TEORICO	
3.1. Reino Fungí.....	10
3.2. Clase basidiomicetes – Familia Polyporaceae.....	11
3.3. <i>Ganoderma lucidum</i>	12
3.4. Morfología <i>Ganoderma lucidum</i>	12
3.5. Metabolitos secundarios como tratamiento clínico.....	12
3.6. Importancia de <i>Ganoderma lucidum</i>	14
3.7. Terapias clínicas antifúngicas.....	14
4. OBJETIVOS	
4.1 General.....	15
4.2 Específicos.....	15
5. METODOLOGIA	
5.1 Obtención de cuerpos fructíferos.....	15
5.2 Obtención de micelio secundario y caldo.....	15
5.3 Obtención de extractos a partir de biomasa por fraccionamiento sólido- líquido.....	16
5.4 Obtención de extractos etanólicos o crudos de los cuerpos fructíferos y biomasa producida en medio líquido de <i>G. lucidum</i>	16
5.5 Obtención de fracciones por separación líquido-líquido.....	17
5.6 Obtención de extractos a partir de caldo por fraccionamiento líquido-líquido.....	18
5.7 Caracterización química de los extractos crudos, fracciones y caldo.....	18
5.8 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos crudos, fracciones y caldo.....	18
6. RESULTADOS Y DISCUSION	
6.1. Obtención de extractos.....	19
6.2. Caracterización química de los extractos crudos, fracciones y caldo.....	19
6.2.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD).....	20
6.2.2. Cromatografía en Capa Delgada con reveladores genéricos y específicos.....	22
6.3. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos crudos, fracciones y caldo.....	24
7. CONCLUSIONES.....	25
8. RECOMENDACIONES.....	26
9. BIBLIOGRAFIA.....	26
10. ANEXOS.....	30

RESUMEN

Las infecciones humanas y animales causadas por hongos han aumentado considerablemente en los últimos años, algunos de los hongos que se ven altamente implicados en estas enfermedades son los hongos del género *Fusarium*, no solo de manera epidérmica, sino también sistémicos. *Ganoderma lucidum* ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y antitumorales, se encuentran reportes de actividad antibacteriana y antiviral, pero pocos reportes sobre actividad antifúngica. En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de extractos obtenidos a partir del cuerpo fructífero (maduro – esporulado e inmaduro – no esporulado) de *Ganoderma lucidum*, adquiridos en un cultivo en Cumarál (Meta), del micelio cultivado en medio líquido y del caldo de cultivo, éstos posteriormente fueron probados frente a cepas de *Fusarium* de interés clínico. Los extractos se obtuvieron empleando diferentes fraccionamientos, seriado con biomasa y líquido-líquido partiendo del micelio y de los cuerpos fructíferos liofilizados con solventes de diferente polaridad, partiendo del más apolar, Éter de petróleo, diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etilo (AcOEt) y etanol (EtOH), éste último es el de mayor polaridad. A su vez, se realizó cromatografía de capa delgada (CCD) para separar los diferentes compuestos según su polaridad y capacidad de adsorción, caracterizados por tinción con cinco reveladores: Vainillina, cloruro de antimonio III, reactivo de Neu, y anisaldehído, lográndose reconocer bandas con tonalidades correspondientes a terpenoides, cumarinas, flavonoides, glucósidos, aldehídos y cetonas. Finalmente, a pesar de la variedad de metabolitos encontrados en *Ganoderma lucidum*, no se presentó ninguna inhibición hacia los *Fusarium* estudiados, lo cual se puede deber a que estos no tienen un blanco de acción específico hacia la membrana del patógeno.

Palabras clave: *Ganoderma lucidum*, estadios de desarrollo, polaridad y apolaridad, actividad antifúngica, extractos, CCD.

1. INTRODUCCION

Las infecciones humanas y animales causadas por hongos han aumentado considerablemente en los últimos años siendo una causa muy alta de mortalidad, no solo en Colombia sino en el mundo. Algunos de los hongos que se ven altamente implicados en estas enfermedades son los hongos del género *Fusarium*, no solo de manera epidérmica, sino también sistémicos. Una de las causas de este aumento es que estos hongos han empezado a tener una alta resistencia a los antimicóticos, lo cual ha ejercido cierta influencia sobre la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos.

Los hongos patógenos de interés en el estudio usualmente se tratan con Anfotericina B, el cual se ha considerado el “gold standar” en terapias antifúngicas a pesar de su alta toxicidad. Después de un tiempo, se introdujeron nuevas formulaciones como los triazoles (fluconazol e itraconazol, entre otros) con lo que se aceleró el desarrollo de nuevas drogas, pero se sigue conservando su toxicidad.

Por estas razones, se requiere orientar los esfuerzos en la búsqueda de nuevos antimicóticos que superen dichas limitaciones e implicaciones de toxicidad y que sean de origen natural. Algunos estudios realizados en Brasil, mostraron que había actividad antifúngica y antibacteriana en extractos crudos de algunos basidiomicetes, también han revelado que existen al menos 270 especies de hongos que poseen propiedades terapéuticas y farmacológicas relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios. Entre estos hongos se encuentra el hongo *Ganoderma lucidum*, el cual tras varias investigaciones ha mostrado que sus metabolitos secundarios poseen potente efectividad contra algunas bacterias, pero no hay estudios de este frente a hongos patógenos; se plantea entonces la evaluación de metabolitos secundarios de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a cepas de *Fusarium spp.* aisladas de lesiones en humanos y animales.

Este trabajo hace parte del proyecto “Evaluación de metabolitos de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a aislamientos de dermatofitos, *Aspergillus* y *Fusarium* de infecciones humanas y animales”, dirigido por el grupo de investigación UNIDIA (Unidad de Investigaciones Agropecuarias).

El objetivo de este trabajo se centra en evaluar los metabolitos secundarios del hongo *Ganoderma lucidum* (Ganodermataceae) con actividad antifúngica frente a aislamientos de *Fusarium spp.* epidérmicos y sistémicos, comparando extractos de los hongos en diferentes

estadios de desarrollo, inmaduro (sin esporular), maduro (esporulado), micelio secundario producido en medio líquido y el medio líquido (*caldo*) en donde se produjo este micelio.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION:

Durante las últimas décadas se ha observado a nivel mundial un notable aumento de las infecciones causadas por hongos y un incremento de la resistencia farmacológica de varias especies de hongos a los diferentes antimicóticos que se utilizan en la práctica médica (Mesa-Arango *et al.* 2004). Entre los hongos más implicados en las infecciones oportunistas encontramos el género *Fusarium* (Petrikos & Skiada, 2007). En los últimos años las infecciones micóticas han mostrado un incremento importante afectando a gran parte de la población, lo cual disminuye la calidad y expectativas de vida por la morbilidad; unido esto a la resistencia que han empezado a tener estos agentes a los antimicóticos, lo cual ha ejercido cierta influencia sobre la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos, ligado al empeño de encontrar medicamentos para el manejo del cáncer, en donde algunos antifúngicos con los que hoy en día contamos son medicamentos fallidos contra tumores. Esta situación ha llevado a explorar y valorar el uso de productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos, con un mayor espectro de acción y menor toxicidad.

Colombia por su ubicación geográfica, variedad en su vegetación, clima y otros factores favorece el desarrollo de una gran diversidad de hongos macromicetos. Existen sin embargo, muy pocas publicaciones sobre sus propiedades medicinales y reportes en la evaluación de extractos de hongos introducidos con efectos antifúngicos. Algunas investigaciones relacionan actividad antitumoral e inmunomoduladora de extractos de diferentes especies pertenecientes a la división Basidiomycota (Yi lu). Teniendo en cuenta el efecto antitumoral y actividad antimicrobiana (bacterias y virus) de extractos de este grupo, se considera de interés en el campo del estudio de nuevos antifúngicos.

Teniendo en cuenta los anteriores factores, los hongos disponen de una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad biológica, los cuales podrían ser utilizados como una alternativa para el diseño y formulación de fármacos para tratamiento clínico. La familia Ganodermataceae, constituye un grupo de hongos productores de metabolitos secundarios con atribuciones farmacológicas (Berovic *et al.* 2003). Dentro de las especies pertenecientes a esta familia, *Ganoderma lucidum* ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y antitumorales (Wang & Ng 2005). Adicionalmente se encuentran reportes de actividad antibacteriana y antiviral (Li *et al.* 2005), pero son pocos los reportes sobre actividad antifúngica (Ofodile *et al.* 2005). Se plantea entonces encontrar metabolitos

secundarios de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a aislamientos de *Fusarium* spp. de interés clínico.

3. MARCO TEORICO

3.1 Reino Fungi

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos, solo un pequeño número son patógenos a animales y plantas. Inicialmente, los hongos fueron clasificados dentro del Reino Plantae ya que fueron considerados organismos inmóviles presentando estructuras que se asientan firmemente en el sustrato sobre el que crecían. Sin embargo, cuando se ha aplicado la biología molecular en los estudios taxonómicos se ha observado que están más próximos al Reino Animalia que al Plantae. Los hongos son organismos eucariotas típicos y sus células se diferencian de las células de las plantas en la composición de la pared celular, en que carecen de cloroplastos y clorofila, y de las humanas en que tienen pared celular y en la presencia de ergosterol en la membrana citoplásmica (Santafe & Zuluaga, 2007).

Actualmente el reino de los hongos se clasifica en cinco Divisiones: Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota (Hawksworth *et al.*, 1995; Alexopoulos *et al.*, 1996; Schübler *et al.*, 2001.).

División *Chytridiomycota*: Es la división definida por la presencia de zoosporas, con un solo flagelo liso con pequeños pelos laterales, que le permite una adaptación a hábitats acuáticos (Moore, 1996).

División *Zygomycota*: Se caracterizan por su reproducción sexual por la fusión de dos gametangios, la cual culmina en la formación de la zigospora (Moore, 1996).

División *Basidiomycota*: Según Hawksworth y colaboradores en 1995, esta división cuenta con cerca de 23,000 - 30,000 especies, según Kirk y colaboradores en el 2001 incluye los hongos macroscópicos más comunes como *Amanita muscaria*, setas comestibles y royas. El grupo se caracteriza por sus basidiosporas, las cuales cuentan con un único núcleo haploide y se producen en una célula especializada llamada basidio. La familia Ganodermataceae hace parte de este grupo y dentro de ella *Ganoderma lucidum*.

División *Ascomycota*: Es la división más extensa agrupando entre 30,000 a 32,000 especies (Hawksworth *et al.*, 1995; Moore, 1996). Se caracterizan por formar sus esporas sexuales dentro de un asco. En esta división se encuentran las levaduras utilizadas en la industria para la obtención de alcohol y en industria alimentaria están las trufas, en medicina para la obtención de antibióticos como la penicilina por el uso de *Penicillium chrysogenum* y patógenos como *Coccidioides immitis*, agente causal de la enfermedad de fiebre del valle (Mueller *et al.*, 2004).

División *Glomeromycota*: Se caracteriza por carecer de cualquier tipo de reproducción sexual y ser simbiontes obligados de plantas terrestres (Schübler *et al.*, 2001).

3.2 Clase Basidiomycetes - Familia Polyporaceae .

Presentan una fase vegetativa formada por micelio macroscópico. Los basidiomicetos pasan por tres fases de desarrollo que corresponden a tres formas de micelio: primario, secundario y terciario. El primero es el micelio que se origina luego de la germinación de una basidiospora, está formado por hifas septadas, monocarióticas y haploides. El micelio secundario se deriva del primario, y en éste las hifas son dicarióticas. Se forman estructuras en forma de grapa (fíbulas) para mantener la condición dicariótica, migran los núcleos de un septo a otro; en esta fase las hifas forma un pseudotejido llamado plecténquima, que es pseudotejido del carpóforo. El micelio terciario corresponde a la parte fértil del cuerpo fructífero, se encuentra dispuesta en un estrato definido, el himenio, en el cual se forman los basidios y las basidiosporas. El carpóforo se encuentra constituido por un pie (**estípite**), que sostiene una estructura en forma de cúpula, el sombrero (**píleo**), en cuya parte inferior se encuentra el himenio, formado por láminas tubos o poros. Cuando el carpóforo está joven el himenio se encuentra protegido por una tela muy delgada, llamada velo parcial, que al romperse deja una estructura sobre el estípite llamado anillo; en algunos hongos toda esta estructura se encuentra envuelta en un velo universal, el cual al romperse forma unas escamas sobre el píleo (Trigos- Landa, 2000).

Existen alrededor de 25 000 especies de basidiomicetes de las cuales 500 pertenecen a la familia *Polyporaceae* distinguiéndose de otras que presentan poros, por su típica dureza exterior y a que crecen sobre la madera como descomponedores, la mayoría de estos hongos incluso puede encontrarse durante tiempo seco o en el invierno, algunos son perennes y otros producen basidiocarpos de corta duración (Volk, 2000).

3.3 *Ganoderma lucidum*

Este hongo también conocido como Reishi, pertenece al género *Ganoderma* caracterizado por tener un sistema hifal dimítico lo que le confiere dureza estructural, unas inusuales esporas de color café con una doble pared y causa putrefacción blanca en la madera (degradan la lignina). Crece libremente en bosques de casi todas las latitudes cálidas del planeta, tanto asiáticas como americanas y amazónicas, más en los climas subtropicales que en los templados. Su crecimiento natural se desarrolla anualmente en el tronco de los árboles dañados o muertos, sobre todo roble, arce, olmo, sauce, magnolia, algarrobo y ciruelo (Santafé & Zuluaga, 2007).

3.4 Morfología de *Ganoderma lucidum*.



Fig. 1. Cuerpo fructífero sin esporular de *Ganoderma lucidum*, foto tomada por Niño-Arias, 2010.

Carpóforo: 2-20 cm de largo; al principio irregularmente nudoso, pero a través de madurez más o menos adquiere una estructura definida (oreja ó riñón); con una superficie a menudo lisa a rugosa con una apariencia brillante barnizada, cuando madura presenta un color castaño rojizo con zonas amarillo brillante y blanco hacia el margen; algunas veces presenta tintes azulados. Alcanza hasta 5 cm de espesor al final de su crecimiento.

Himenio: Tubos de 2 cm de profundidad, la superficie del poro es blanca, llegando a ser castaño oscuro a medida que envejece; de 4-7 poros por mm (diminutos a simple vista).

Estípite: A veces ausente, pero comúnmente presente; 3-14 cm de longitud; a 3 cm espesor; del mismo color del carpóforo; por lo general crece en forma lateral.

Rasgos microscópicos: Esporas más o menos elípticas, a veces con un extremo truncado; a ampliaciones más grandes pueden parecer de forma áspera (Santafe & Zuluaga, 2007).

3.5 Metabolitos secundarios como tratamiento clínico.

Los medicamentos de origen natural (microbiano, vegetal o animal) ocupan la mayoría del mercado para tratamientos en salud humana. Ejemplos como ciclosporina y lovastatina

claramente demuestran el potencial innovador de los productos naturales y su impacto en el progreso del descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Grabley & Thiericke 2000).

Aunque los actuales enfoques en el descubrimiento de nuevos fármacos, como la química combinatoria y los diseños de modelación computacional, han ganado un mayor protagonismo en los últimos años, los productos naturales continúan siendo la mayor fuente de moléculas bioactivas (Gräfe 2000). Tradicionalmente una de las fuentes naturales más estudiadas en el campo del desarrollo de nuevos fármacos son las plantas (etnofarmacología); sin embargo el uso de microorganismos como fuente de moléculas bioactivas también ha sido ampliamente explorado y desarrollado (antibióticos).

Ambas fuentes ofrecen sus propias ventajas en cuanto a la naturaleza química de las moléculas; en plantas las rutas metabólicas de los terpenoides y fenilpropanoides son predominantes, mientras que en microorganismos lo son las rutas de las policetonas (Verpoorte 1998). En contraste con las plantas, en el trabajo con microorganismos es más sencillo obtener mayor cantidad de biomasa para el aislamiento de los metabolitos, además de ser más viable la inducción de su biosíntesis. En el campo de los antimicrobianos, los actinomycetes han sido y permanecen siendo una de las mayores fuentes de nuevos compuestos (Horan 1994 citado en Cragg *et al.* 1997).

Aunque la extracción de compuestos bioactivos a partir de diferentes hongos tiene una larga historia, hasta hace poco tiempo se han desarrollado estudios donde se evidencia la diversidad y el uso de los metabolitos secundarios generados por hongos diferentes a los producidos por los hongos mitospóricos (Grabley & Thiericke 2000). En cuanto a hongos macromicetos, desde la antigüedad, civilizaciones como la mesopotámica y aztecas los usaban para fines terapéuticos (Ruiz 2001). Actualmente los hongos basidiomicetos están siendo objeto de interés en el campo de la farmacología gracias a las propiedades inmunomoduladoras de sus metabolitos (Lull *et al.* 2005).

Debido a que no se encuentran muchos compuestos naturales puros para ser sometidos a pruebas para determinar actividad biológica, se usan extractos de fuentes naturales; pero estos pueden presentar problemas a nivel experimental, como el solapamiento del efecto biológico por mayores concentraciones de otros metabolitos sin función biológica o falsos positivos por sinergismo entre varios compuestos. Por esta razón es necesario realizar un fraccionamiento de los extractos de origen natural. Este enfoque es también empleado en los programas de pruebas de tecnología de punta (“high throughput screening”) para los desarrollos más avanzados en

farmacología (Schmid *et al.* 1999). En los últimos años se han descubierto metabolitos bioactivos a partir de hongos (Russell & Paterson 2006).

3.6 Importancia de *Ganoderma*

Los hongos que pertenecen al género *Ganoderma* se encuentran en la cima de la medicina oriental desde hace muchos años, y es uno de los grupos más importantes de productos naturales en Asia y Norte América (Berovic *et al.* 2003). *Ganoderma* es un basidiomycete polyporal, perteneciente a la familia Ganodermataceae, de características lignocelulolíticas, conocido como “Ling zhi” en China y “Reishi” en Japón. *Ganoderma* ha sido utilizado ancestralmente por las culturas orientales por sus bondades medicinales, en el tratamiento de migraña, hipertensión, artritis, bronquitis, asma, diabetes, hipercolesterolemia y problemas cardiovasculares. También se afirma que tiene propiedades anticancerígenas y antimicrobianas. Dentro de los metabolitos bioactivos se destacan polisacáridos y terpenoides especialmente triterpenos (Paduch *et al.* 2007, Zjawiony 2004).

3.7 Terapias clínicas antifúngicas

Por más de 50 años Anfotericina B fue considerado el “gold standar” en terapias antifúngicas a pesar de su alta toxicidad. Hacia los años 90 se introdujeron nuevas formulaciones como los triazoles (fluconazol e itraconazol) con lo que se aceleró el desarrollo de nuevas drogas. Años más tarde se introdujeron otros triazoles y nuevas equinocandinas los cuales contribuyeron con nuevas opciones de tratamiento (Petrikos & Skiada 2007). Aunque Anfotericina B se considere el “gold standar” de las terapias antifúngicas, patógenos oportunistas como *Fusarium*, *Sporothrix schenkii* y *Scedosporium apiospermum* presentan resistencia a este antifúngico (Ellis 2002).

Sin embargo en los últimos años se han visto cambios muy marcados en cuanto al diagnóstico y tratamiento de las micosis, donde han cobrado gran importancia las micosis invasivas, constituyendo así una problemática en el uso de antimicóticos por el aumento de infecciones sistémicas, caracterizadas por una alta mortalidad. También se viene presentando aumento en la falla terapéutica asociada a resistencia, sobre todo en candidiasis y aspergillosis invasivas y un aumento de infecciones causadas por hongos emergentes (Córdoba *et al.* 2008, Donnelly *et al.* 2008, Espinel 2008, Moellering 2007, Rogers 2006, Chamilos & Kontoyiannis 2005).

4. OBJETIVOS:

4.1 GENERAL

- Evaluar metabolitos secundarios del hongo *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a cuatro cepas de *Fusarium* de interés clínico.

4.2 ESPECIFICOS

- Separar tipos de metabolitos de acuerdo a su polaridad a partir de biomasa de *Ganoderma lucidum*.
- Caracterizar químicamente los extractos a nivel de grupo funcional.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos del hongo *Ganoderma lucidum* frente a hongos de interés clínico.

5. METODOLOGIA

5.1 Obtención de cuerpos fructíferos.

Los cuerpos fructíferos del hongo se obtuvieron de un cultivo localizado en Cumarál, Meta, tanto los inmaduros-no esporulados (Muestra 1 o M1) 30 g, como los maduros-esporulados (Muestra 2 o M2) 30 g (**ANEXO 10.1**). Estas muestras se liofilizaron para reducir la mayor cantidad de agua, seguido a esto, se trituraron en un molino, para facilitar la extracción por maceración en frío.

5.2 Obtención de micelio secundario y caldo.

El micelio secundario (Muestra 3 o M3) (**ANEXO 10.1**) 30 g fue producido en medio de cultivo líquido, bajo las condiciones optimizadas por Romero & Zárate en 2009 (**ANEXO 10.2**). Este micelio fue filtrado por vacío y liofilizado para eliminar así la mayor cantidad de agua, la cual habría podido obstaculizar una buena extracción de los metabolitos presentes en la muestra. El caldo (Muestra 4 o M4) obtenido tras la filtración se tomó, para posterior extracción.

5.3 Obtención de extractos a partir de biomasa por fraccionamiento sólido- líquido

Una parte de la biomasa de los cuerpos fructíferos inmaduros- M1 (10 g), maduros- M2 (10 g) y el micelio secundario- M3 (10 g) se llevó a extracción por separado en éter de petróleo y bajo agitación constante durante 48 h, para arrastrar los compuestos de polaridad más baja, luego de esto, se filtraron; los tres marcos (biomasa filtrada) se llevaron de nuevo a extracción con el mismo solvente por otras 48 h y posteriormente se filtraron; los extractos de 48 y 96 h se almacenaron a 4°C.

Posteriormente, cada uno de los marcos fueron llevados a extracción con diclorometano (CH_2Cl_2) para arrastrar los compuestos de polaridad media, por 48 h, estos fueron filtrados, y los marcos llevados a extracción con el mismo solvente por 48 h más. Los extractos de CH_2Cl_2 de 48 y 96 hrs se almacenaron a 4°C.

Este mismo procedimiento se realizó de manera seriada con los solventes acetato de etilo (AcOEt) para compuestos de polaridad media-alta y etanol (EtOH) compuestos de polaridad alta. Todos los extractos fueron se almacenaron a - 4°C.

Los extractos se concentraron por rotaevaporación hasta sequedad a presión reducida, se determinó el peso de cada uno de los extractos, para posteriormente resuspenderlos en el mismo solvente de extracción (1 mL).

5.4 Obtención de extractos etanólicos o crudos de los cuerpos fructíferos y biomasa producida en medio líquido de *G. lucidum*:

Otra porción de la biomasa de los cuerpos fructíferos M1 (10 g), M2 (10 g) y micelio secundario M3 (10 g), se colocaron por separado en una licuadora con etanol al 96 % v/v y se procedió a extracción con el mismo solvente durante 48 horas por el método de maceración, este se realizó en frío y bajo agitación.

Luego los extractos se filtraron y concentraron por rotaevaporación hasta el mínimo volumen o sequedad a presión reducida, logrando de esta forma extractos etanólicos totales, llamados extractos crudos. Este proceso se realizó por duplicado, obteniendo así dos extractos A y B de cada una de las muestras; los extractos A se concentraron por rotaevaporación hasta sequedad a presión reducida, se halló el peso de cada uno de los extractos, cada uno de ellos fue suspendido en (1 mL) y los extractos B a volumen de 2.5 mL.

5.5 Obtención de fracciones por separación líquido-líquido:

Se tomó el extracto crudo B de cada una de las tres muestras (M1, M2 y M3) por separado, y se le adicionó 2.5 mL de H₂O destilada (porción hidroalcohólica) y se sometieron a separación discontinua líquido-líquido con bencina de petróleo (5 mL) por 3 repeticiones, así se obtuvieron las fracciones de compuestos apolares, grasas y aceites que se denominó fracción petrol y se llevó a sequedad en el rotaevaporador a presión reducida. Luego se sometieron las fracciones hidroalcohólicas a fraccionamiento con diclorometano (CH₂Cl₂), solvente de polaridad media, igualmente con 3 repeticiones de 5 mL cada una obteniendo las fracciones CH₂Cl₂, que también se concentraron en el rotaevaporador a presión reducida. Por último, las fases hidroalcohólicas se sometieron a fraccionamiento con acetato de etilo (AcOEt), solvente de mayor polaridad que los anteriores, con 3 repeticiones de 5 mL cada una obteniendo las fracciones AcOEt, que se llevaron a sequedad en el rotaevaporador a presión reducida. Igualmente, los residuos etanólicos (fracciones hidroalcohólicas) de todos los extractos obtenidos se concentraron por rotaevaporación hasta sequedad a presión reducida, se determinó el peso de cada uno de los extractos, para luego resuspenderlos en cada uno de los solventes de extracción (1 mL). Este procedimiento se muestra a continuación en la figura 2:

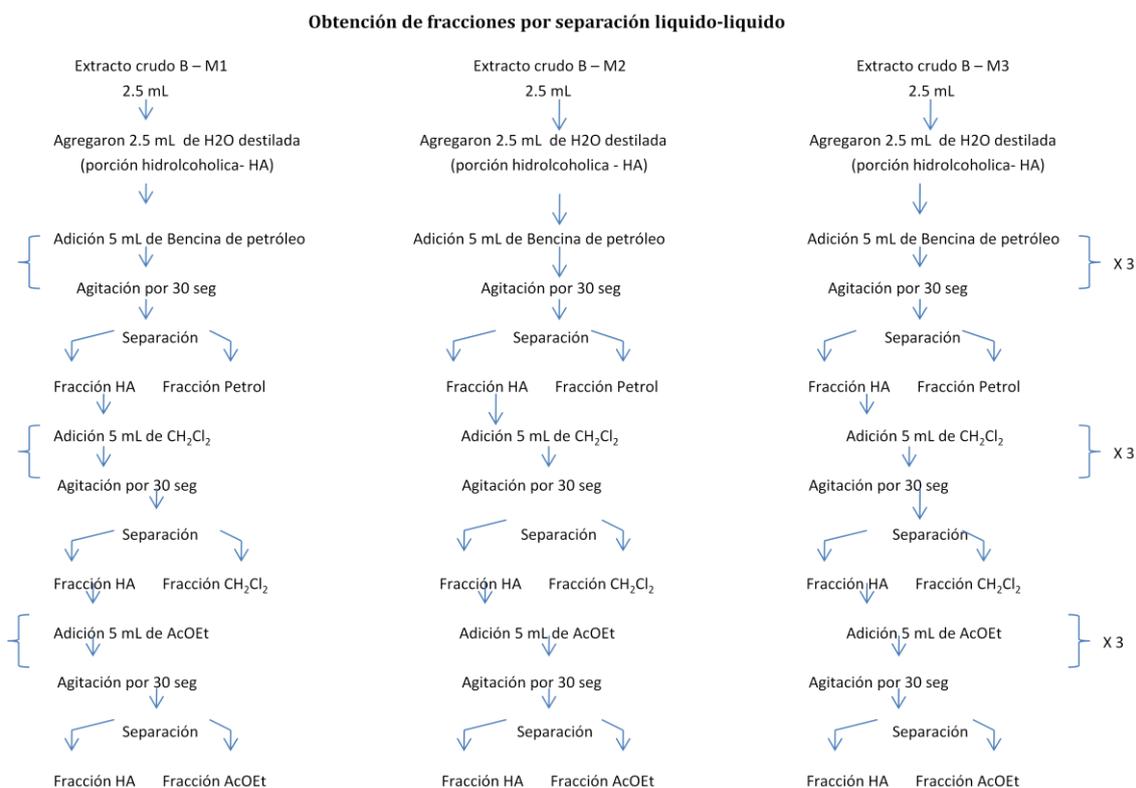


Figura 2. Diagrama de flujo de obtención de fracciones por separación L-L.

5.6 Obtención de extractos a partir de caldo por fraccionamiento líquido-líquido

En un embudo de separación se tomaron 500 mL de caldo (Muestra 4 o M4), se le adicionaron 50 mL de Bencina de petróleo, se agitó por 30 segundos y posteriormente se tomó la porción de bencina, este procedimiento se realizó cinco veces (utilizando el mismo volumen de solvente) hasta obtener una fracción de extracto de bencina del caldo de 250 mL aproximadamente. Este procedimiento se realizó de manera seriada y de la misma forma con los solventes CH₂Cl₂ y AcOEt; finalmente se tomó el líquido restante y se denominó extracto *caldo*. Los cuatro extractos se llevaron a sequedad en rotaevaporador a presión reducida, se determinó el peso de cada uno de los extractos, cada uno de ellos fue suspendido en (1 mL).

5.7 Caracterización química de los extractos crudos, fracciones y caldo.

Se realizaron cromatografías en capa delgada (CCD) tomando alícuotas de los extractos etanólicos o crudos, fracciones líquido- líquido y caldo, se sirvieron en placas de sílica gel de poro fino con indicador de fluorescencia en base de aluminio (Alugram® Nano-Sil G/UV₂₅₄ – Macherey-Nagel). Para la fase móvil se probaron diferentes combinaciones de solventes hasta obtener la mejor resolución de bandas para las diferentes muestras. La detección de los compuestos se hizo por fluorescencia bajo luz ultravioleta (254nm y 366nm) y por tinción con reactivos para detección de diferentes tipos estructurales (Sherma 1996).

Los reactivos para tinción de CCD se seleccionaron basándose en grupos funcionales y las posibles estructuras básicas en los que se han reportado metabolitos con actividad antimicrobiana. De este modo se probó un revelador genérico Vainillina (en H₂SO₄) y reveladores específicos: cloruro de antimonio III (terpenoides), reactivo de Neu – ácido difenilborico-2-aminoetil ester (flavonoides), hidróxido de potasio (cumarinas), hidroxilamina – cloruro férrico (lactonas) y 2,4-dinitrofenil hidracina (cetonas) (Jork *et al.* 1990, Geissmann & Griffin 1971, Merck 1980) (ANEXO 10.4).

5.8 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos crudos, fracciones y caldo.

A partir de la concentración inicial de cada uno de los extractos (ANEXO 10.3), usando como solvente DimetilSulfoxido DMSO, se llevó cada extracto a una concentración de 10mg/mL, luego se impregnaron discos de papel filtro (Wathman No. 1) de 6mm de diámetro con 10 µL de cada dilución, quedando así una cantidad de 100 µg de extracto por cada disco (Vivot *et al.* 2007; Abad- Reyes, 2006; Zuluaga et al, 2007).

Las cepas de *Fusarium* (ANEXO 10.7) se incubaron para producción de conidios en agar avena (ANEXO 10.2.2) durante 5 días a 28°C.

Se evaluó la actividad antifúngica utilizando agar Mueller-Hinton suplementado con 2% de glucosa (ANEXO 10.2.2). Se obtuvo una suspensión de conidios por desprendimiento con perlas y solución salina haciendo diluciones hasta lograr una concentración de 10^5 conidios/mL. Se sembraron masivamente 100 μ L de la suspensión, se colocaron los discos previamente impregnados con cada uno de los extractos; finalmente se incubaron a 28°C y se midió el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento en mm a las 48 y 72 h de cultivo. Se montaron controles con los solventes (Éter de petróleo, CH_2Cl_2 , AcOEt y EtOH y DMSO), impregnando discos de papel *Wathman* (0.6 cm de diámetro) con 10 μ L. También se montó control de crecimiento y como control positivo se utilizó terbinafina disuelta en DMSO (a una concentración de 2,5 mg/mL), a cada disco se le impregnaron 10 μ L de esta solución, se escogió terbinafina ya que es uno de los antifúngicos más utilizados para el tratamiento de micosis superficiales y sistémicas; todos los bioensayos se realizaron por cuadruplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Obtención de extractos

Doce extractos a partir de fraccionamiento sólido-líquido

Extractos a partir de biomasa por fraccionamiento solido- liquido	Éter de petróleo	CH_2Cl_2	AcOEt	EtOH
	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2
	M3	M3	M3	M3

Seis extractos crudos a partir de cuerpos fructíferos y biomasa.

Extractos etanólicos o crudos de los cuerpos fructíferos y biomasa producida en medio líquido de <i>G. lucidum</i>	Extracto Crudo A	Extracto Crudo B
	M1	M1
	M2	M2
	M3	M3

Doce extractos a partir de la separación líquido-líquido:

Fraciones por separación líquido-líquido	Eter de petróleo	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Hidroalcoholica
	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2
	M3	M3	M3	M3

Cuatro extractos a partir de separación líquido-líquido del caldo.

Extractos a partir de caldo por fraccionamiento líquido-líquido	Éter de petróleo	CH₂Cl₂	AcOEt	Caldo
	M4	M4	M4	M4

6.2 Caracterización química de los extractos crudos, fracciones y caldo.

6.2.1 Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Para desarrollar la cromatografía se realizaron ensayos previos con diferentes solventes, los cuales fueron escogidos según los metabolitos que se esperaban en cada una de las fracciones. Además, se tuvo en cuenta la polaridad de los solventes tratados para realizar el procedimiento de fraccionamiento. A continuación se presenta una tabla con los solventes seleccionados para cada cromatografía y muestra:

Tabla 1. Solventes y placas seleccionadas para las cromatografías según tipos de extracción y muestra.

Extracto	Muestra	Solventes	Proporción	Tipo de Placa
Bencina	Seriado biomasa M1	Hexano - Acetona	9 : 1	Sílica gel
	Seriado biomasa M2			
	Seriado biomasa M3			
	Seriado líquido-líquido M1			
	Seriado líquido-líquido M2			
	Seriado líquido-líquido M3			
CH ₂ Cl ₂	Seriado biomasa M1	Cloroformo : AcOEt	7 : 3	Sílica gel
	Seriado biomasa M2			
	Seriado biomasa M3			
	Seriado líquido-líquido M1			
	Seriado líquido-líquido M2			
	Seriado líquido-líquido M3			
AcOEt	Seriado biomasa M1	Cloroformo : MetOH	9:1	Sílica gel
	Seriado biomasa M2			
	Seriado biomasa M3			

	Seriado liquido-liquido M1			
	Seriado liquido-liquido M2			
	Seriado liquido-liquido M3			
Etanol	Seriado biomasa M1	Cloroformo : MetOH	1:1	Sílica gel
	Seriado biomasa M2			
	Seriado biomasa M3			
	Hidroalcohólica M1	Cloroformo : MetOH	1:1	RP18
	Hidroalcohólica M2			
	Hidroalcohólica M3			
Caldo	Bencina de petróleo	Cloroformo : MetOH	1:1	Sílica gel
	CH ₂ Cl ₂			
	AcOEt			
	Caldo			

A continuación se muestran las diferentes cromatografías corridas con los solventes y placas especificadas en la tabla 1 para cada muestra.

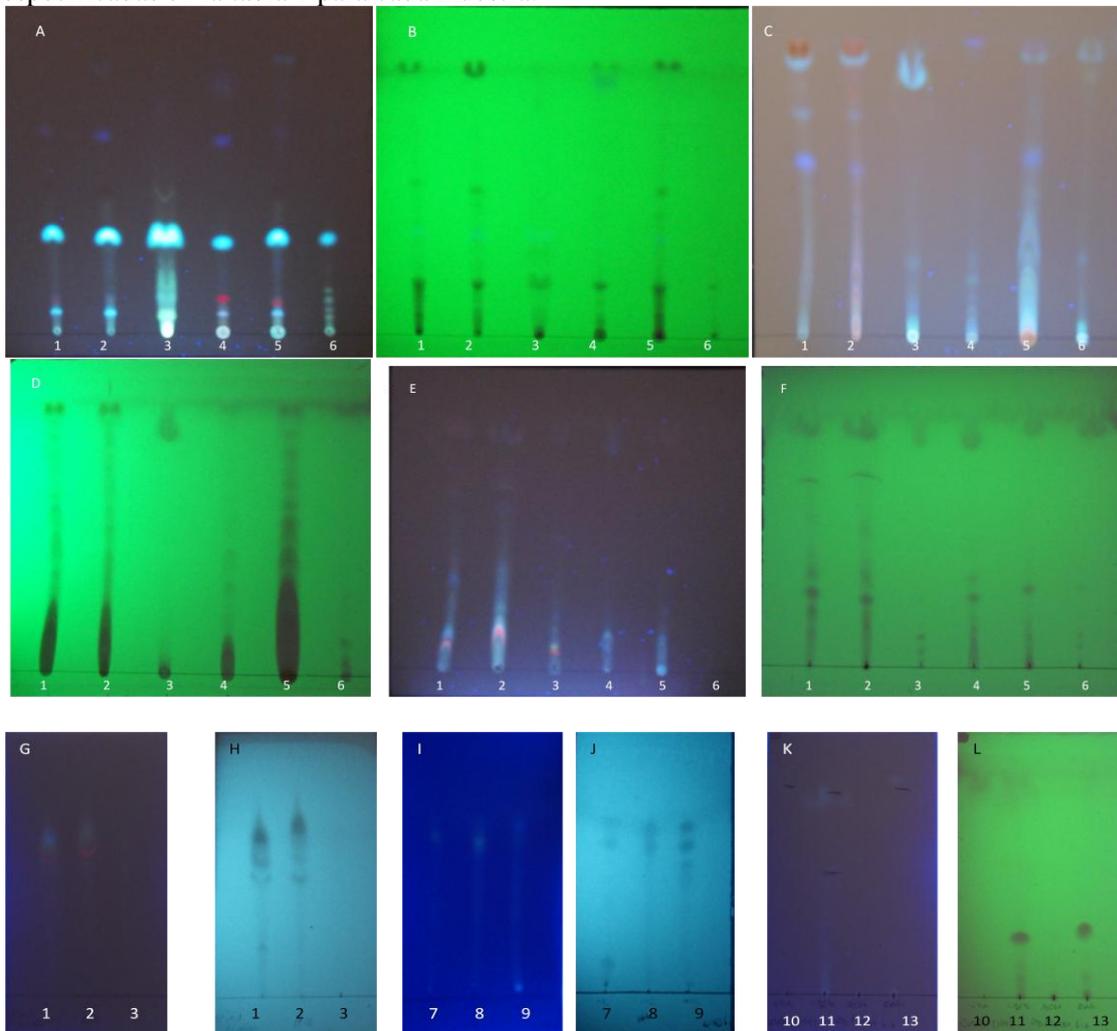


Figura 3. Cromatografía de capa delgada sin revelar. A) Bencina de petróleo luz UV onda larga (Hexano-Acetona 9:1). B) Bencina de petróleo luz UV onda corta (Hexano-Acetona 9:1). C) CH₂Cl₂ Luz UV onda larga (Cloroformo:AcOEt 7:3). D) CH₂Cl₂ Luz UV onda corta (Cloroformo:AcOEt 7:3). E) AcOEt luz UV onda larga (Cloroformo- MetOH 9:1). F) AcOEt luz UV onda corta (Cloroformo- MetOH 9:1). G) Etanol biomasa luz UV onda larga (Cloroformo:MetOH 1:1). H) Etanol biomasa luz UV onda corta (Cloroformo:MetOH 1:1). I) Hidroalcohólica luz UV onda larga (Cloroformo:MetOH 1:1). J) Hidroalcohólica luz UV onda corta (Cloroformo:MetOH 1:1). K) Caldo luz UV onda larga (Cloroformo:MetOH 1:1) L) Caldo luz UV onda corta (Cloroformo:MetOH 1:1). 1) Muestra 1 Biomasa. 2) Muestra 2 Biomasa. 3) Muestra 3 Biomasa. 4) Muestra 1 seriado liquido-liquido. 5) Muestra 2 seriado liquido-liquido. 6) Muestra 3 seriado liquido-liquido. 7) Porcion hidroalcohólica M1. 8) Porcion hidroalcohólica M2. 9) Porcion hidroalcohólica M3. 10) Caldo seriado liquido-liquido Bencina. 11) Caldo seriado liquido-liquido CH₂Cl₂. 12) Caldo seriado liquido-liquido AcOEt. 13) Caldo seriado liquido-liquido fracción caldo.

6.2.2 Cromatografía en Capa Delgada con reveladores genéricos y específicos.

Se revelaron las placas de HPTLC con cada uno de los reveladores, el genérico (Vainillina) y los específicos, los datos obtenidos de los Rf están referenciados en el **ANEXO 10.6**. Cabe resaltar que no existen reportes de perfiles de metabolitos en diferentes estadios de desarrollo en hongos, lo que si se evaluó en este estudio.

Las placas reveladas con vainillina (revelador genérico) (**ANEXO 10.6.1**), muestran una presencia inespecífica de alcoholes, fenoles, esteroides y aceites esenciales en todos los estadios de desarrollo del hongo y en el caldo, excepto en la fracción con acetato de etilo, donde no se encontraron estos compuestos; la mayor parte de las bandas, se revelaron en las muestras de bencina de petróleo.

Para las placas reveladas con cloruro de antimonio (III) (terpenoides) (**ANEXO 10.6.2**), existen diferencias en los resultados según las muestras y los métodos de extracción, la mayor cantidad de estos compuestos se encuentran en las muestras de bencina es decir compuestos de polaridad más baja. En las muestras extraídas con CH_2Cl_2 no se evidenciaron bandas en el método de extracción líquido-líquido para la muestra 1; para las muestras con acetato de etilo con método seriado biomasa tampoco se revelaron compuestos terpenoides; finalmente en la fracción hidroalcohólica y en el caldo no hay terpenos tampoco. En estudios previos de *Ganoderma* se ha encontrado que hay una alta concentración de compuestos derivados del ergostano y lanostano (principalmente los esteroides y ácidos lanostánicos) (Santafé & Zuluaga, 2007). Los compuestos químicos con mayores propiedades bioactivas, según Santafé y Zuluaga 2007, son los triterpenoides y polisacáridos. Los polisacáridos existen extensamente en los hongos y son además los mayores componentes de las paredes celulares, sin embargo, los triterpenoides son especialmente encontrados en el género *Ganoderma* y los que han sido aislados corresponden principalmente a ácidos ganodéricos, ácidos lucidénicos y ganodériorios; los ácidos ganodéricos son los que se encuentran en mayor cantidad.

Algunos compuestos de origen terpenoide en estudios previos han mostrado diversos tipos de actividad biológica, por ejemplo anti-VIH-1 (ganoderiol F y ganodermanontriol), anti-colesterol (ácido ganodérico B y C), antihistamínico (ácidos ganodéricos C1 y C2), actividad anti-VIH-1 proteasa (lucidumol B y ganodermanontriol), efectos citotóxicos contra Meth-A (sarcoma) (ganodermanondiol y lucidunoles A y B), carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) (lucidunoles A Y B y ácido ganodérico θ), y T-47D (cáncer de seno) (ganodermanondiol); como también es conocida la inhibición de la glucosiltransferasa de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* (ácidos ganodéricos S1 Y C) (Santafé & Zuluaga, 2007).

Cuando se reveló con el reactivo de Neu (flavonoides) (**ANEXO 10.6.3**) se evidenciaron bandas en las muestras de bencina de petróleo, CH_2Cl_2 y EtOH, mientras que en las muestras de AcOEt, hidrolcohólica y caldo no se detecta presencia de flavonoides. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la arteriosclerosis o el cáncer, además de tener propiedades antivirales; por otra parte en las plantas los flavonoides tienen el papel antifúngico y bactericida (Martínez-Flórez et al, 2003). Los requerimientos estructurales para la actividad antibacteriana y/o antifúngica aún no han sido bien definidos, sin embargo hay un acuerdo de que al menos debe estar presente un grupo OH y cierto grado de lipofilicidad. Estos mismos requerimientos se encuentran en los fungicidas comerciales, los cuales ejercen su toxicidad a través de la acidez del grupo hidroxilo por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Los protones son conducidos a través de la membrana mitocondrial destruyendo el diferencial de protones producidos en el transporte electrónico requerido para la formación de ATP. Para compuestos fenólicos con una dada lipofilicidad, mientras mayor sea su número de grupos hidroxilos, resultarán más eficientes desacopladores, ya que podrían transferir más protones por molécula (Modak et al, 2002)

Con el revelador de hidróxido de potasio (**ANEXO 10.6.4**), se encuentran bandas características de cumarinas, estas fueron evidentes en las muestras 1 y 2 en los solventes (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol). En las fracciones hidroalcohólicas y caldo al igual que en la muestra 3 (micelio secundario) no se evidenciaron estos compuestos, esto nos podría mostrar que las cumarinas se sintetizan cuando el hongo forma el cuerpo fructífero y no durante su etapa inicial de crecimiento (micelio primario o secundario).

Con el revelador para lactonas (Hidroxilamina- cloruro férrico) (**ANEXO 10.6.5**), se observaron bandas características en las muestras de CH_2Cl_2 , AcOEt y Etanol, lo cual muestra una tendencia de lactonas de polaridad media y alta. No se evidenciaron bandas en la porción hidroalcohólica ni en el caldo.

Para las placas reveladas con Dinitrofenil- hidracina (cetonas y aldehídos libres) (**ANEXO 10.6.6**), se encontraron en mayor proporción en los compuestos con solventes de polaridad baja (Bencina y CH_2Cl_2), aunque también se evidencian algunas bandas en los solventes de mayor

polaridad (EtOH y AcOEt), en el caldo y la fracción hidroalcohólica no se muestran o evidencian cetonas ni aldehidos libres.

Finalmente el revelador Anisaldehído (glucósidos) (**ANEXO 10.6.7**), mostró bandas de presencia de estos compuestos en las fracciones de bencina y CH₂Cl₂ en mayor proporción, en el extracto etanólico de seriado biomasa no se evidencian bandas al igual que en la fracción hidroalcohólica. Por otra parte, en el caldo, al cual se le realizó el fraccionamiento líquido-líquido, se encuentran glucósidos en todos los solventes utilizados (Eter de petróleo, CH₂Cl₂, AcOEt y ETOH).

Cardona en el 2001 menciona los componentes activos encontrados en varios estudios de *Ganoderma lucidum*, entre ellos nombra alcaloides, nucleótidos, polisacáridos y triterpenos en el cuerpo frutífero, lo cual es evidenciado y confirmado en este estudio con los reveladores específicos para estos compuestos; por otra parte Cardona en 2001, también nombra los compuestos activos encontrados en el micelio que son polisacáridos, proteínas, esteroides, triterpenos y un ácido graso no saturado, ácido oleico, que también son confirmados como presentes en este estudio basándose en los reveladores específicos de la cromatografía de capa delgada.

6.3. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos crudos, fracciones y caldo (bioensayos).

Tras la evaluación de los extractos de *Ganoderma* frente a los aislamientos de *Fusarium* de interés clínico, se encontró que no hubo inhibición con ninguno de los extractos, lo que no sucedió con el control (terbinafina), el cual sí tuvo resultados inhibitorios y mostró efectividad antifúngica (**ANEXO 10.7**). En los extractos de *Ganoderma lucidum* se han encontrado triterpenoides y estos han tenido inhibición altamente positiva frente a bacterias. Los extractos de setas y sus derivados han demostrado actividades antimicrobianas, entre ellos, los metabolitos secundarios extracelulares como secreciones miceliales presentan actividad antibacteriana y antivírica; por ejemplo, los exudados del micelio del hongo tienen actividad antimicrobiana y antiparasítica contra *Plasmodium falciparum*, el agente causal de la malaria (Chen, 2003). Los polisacáridos de la pared celular de *Ganoderma lucidum* y sus triterpenoides también han mostrado actividad antimicrobiana; más específicamente sus extractos actúan contra *Bacillus* y no parecen tener efecto contra otro tipo de bacterias. Los triterpenos del complejo *Ganoderma applanatum* exhiben actividad antibacteriana principalmente contra bacterias gram positivas, tales como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Gerber *et al.*,

2000). Al observar los resultados obtenidos en varios estudios previos frente a bacterias, en este trabajo se esperaba hubiera una buena respuesta por parte de los metabolitos hacia la inhibición de *Fusarium*, pero no fue así, posiblemente debido a la complejidad de la pared del hongo con respecto a la pared de las bacterias y a la resistencia que puede tener el ergosterol o la síntesis del frente a los extractos de *Ganoderma lucidum*. Además *Fusarium* es un patógeno que posee metabolitos secundarios que generan gran resistencia, tales como tricotecenos, que son tóxicos potentes de las células eucarióticas y causan lesiones dérmicas, alteraciones de la respuesta inmunológica e inhibición de la síntesis de macromoléculas. También presentan fumonisinas que son fitotoxinas y además micotoxinas que interfieren en el metabolismo de los esfingolípidos, asociadas al cáncer esofágico humano y la leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino, estas dos moléculas son demasiado complejas lo cual dificulta la inhibición por parte de este tipo de compuestos de origen natural (Carrillo, 2003).

Por su parte, la terbinafina la cual si inhibió a los cuatro aislamientos de *Fusarium* es un derivado sintético de la alilamina con actividad antimicótica de amplio espectro, esta posee actividad fungicida o fungistática contra las levaduras dependiendo de la especie; es fungicida contra dermatófitos y ciertos hongos dimórficos a bajas concentraciones. La terbinafina ocasiona la muerte celular en el hongo al inhibir la síntesis del ergosterol, componente fundamental de la membrana del hongo y a la acumulación de su precursor, el escualeno. La terbinafina bloquea la síntesis de ergosterol, esencial para la membrana celular fúngica, mediante la inhibición de la enzima escualeno-epoxidasa (MK-Tecnoquímicas, 2010). Esto nos muestra que a pesar de la variedad de metabolitos secundarios encontrados en la caracterización de grupos funcionales de *Ganoderma lucidum* como terpenoides, flavonoides y cumarinas, entre otros, al parecer ninguno de ellos tiene un blanco de acción frente a la enzima escualeno-epoxidasa, la cual es la fundamental para la síntesis de escualeno y por ende la síntesis del ergosterol, tampoco otras enzimas o estructuras relacionadas con la síntesis o integridad de la membrana celular.

7. CONCLUSIONES

- ✓ *Ganoderma lucidum* mostró una variedad de compuestos terpenoides, flavonoides, cumarinas, aldehídos, cetonas y glucósidos en todos los estadios de desarrollo evaluados.
- ✓ La mayor cantidad de compuestos encontrados fueron de origen terpenoide, lo cual se pudo evidenciar con el revelador cloruro de antimonio (III).

- ✓ A pesar de la variedad de metabolitos encontrados en *Ganoderma lucidum*, no se presentó ninguna inhibición hacia los aislamientos de *Fusarium* estudiados, lo cual se puede deber a que estos no tienen un blanco de acción específico hacia la membrana del patógeno, el cual sí tiene la terbinafina.

8. RECOMENDACIONES

1. Dentro de la metodología de fraccionamiento se podría trabajar solvente por solvente y no seriado, es posible que la bencina arrastre la mayoría de los compuestos presentes en el extracto, un fraccionamiento separado permitiría una separación de compuestos y una separación más significativa entre las fracciones.
2. Aumentar la concentración del extracto en los ensayos de actividad antifúngica con el fin de observar si el resultado no inhibitorio es realmente porque no tiene inhibición contra estos hongos o porque la concentración es muy baja.
3. Examinar las muestras por cromatografía de gases para así determinar más específicamente los compuestos encontrados por cromatografía de capa delgada y los reveladores.

9. BIBLIOGRAFIA

- **Abad-Reyes, A ; Bahsas, A; Delgado-Méndez, P; Amaro-Luis, J. ; Tower, N. 2006.** Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Helms. (Apocynaceae). *Avances en Química*, 1 (3), 29-34.
- **Alexopoulos, C, Mims, C, Blackwell, M. 1996.** *Introductory Micology*. John Wiley & Sons. Fourth Edition. EUA.
- **Berovic M., Habijanac J., Zore I., Wraber B., Hodzjar D., Boh B., Pohleven F. (2003).** Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 103: 77-86.
- **Cardona, L. 2001. HONGOS: ALIMENTO Y MEDICINA** Escuela de Biociencias Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Disponible en la web: <http://www.ganocafeperumundo.com/ganoderma-lucidum/universidad-nacional-de-colombia-sede-medell%C3%ADn-ganoderma-lucidum-contratodas-las-enfermedades/> última visita 16 de mayo de 2010.
- **Carrillo, L. (2003).** Los Hongos de los Alimentos Y Forrajes & Microbiología Agrícola. texto de curso doctoral. In *Departamento de Ciencias*. Argentina: Universidad Nacional de Salta.

- **Chen, A.W, 2003.** A fresh look at an ancient mushroom *Ganoderma lucidum* (Reishi). Vol. 51(2):14-24.
- **Córdoba S., Rodero L., Vivot W., Abrantes R., Davel G., Vitale R. (2008).** In vitro interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. International Journal Antimicrobial agents, p 171-174.
- **Chamilos G, Kontoyiannis DP (2005)** Usistance mechanisms os *Aspergillus fumigatus*. Drug resistance updates. p 344-358.
- **Cragg G, Newman D, Snader K (1997)** Natural Products in Drug Discovery and Development. Journal Natural Products 60: 52-60
- **Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM (2008)** Antifungal photodynamic therapy Microbiological Research, 163:1-12.
- **Ellis, D. (2002).** Amphotericin B: Spectrum and resistance. Journal of antimicrobial Chemotherapy. Suppl .SI 7-10.
- **Espinel-Ingroff A. (2008)** Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. Revista Iberoamericana de Micología, 25:101-106
- **Geissmann TA & Griffin TS. (1971).** Sesquiterpene lactones: Acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination.
- **Gerber, A.L., Amania, A. Jr., Monache, D., Bianchi, N. Jr., y Smania, E. de F.A. 2000.** Triterpenes and sterol from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat (Aphyllophoromycetidae). IJMM. 2:203-312.
- **Grabley S, Thiericke R (2000)** The Impact of Natural Products on Drug Discovery In Grabley S, Thiericke R. Drug Discovery from Nature. Springer- Verlag, Berlin.
- **Gräfe U (2000)** Secondary Metabolites: From Past to Present. In Grabley S, Thiericke R. Drug Discovery From Nature. Springer- Verlag, Berlin
- **Hawksworth, D, Kirk, M, Sutton, B & Pegler, D. 1995.** *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th Edition . Wallingford: CABInternational
- **Jork H, Funk W., Fischer W & Wimmer H (1990).** *Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods*. Weinheim.
- **Kirk, P, Cannon, P, David, J, Stalpers, J. 2001.** Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, ninth ed. CAB International, United Kingdom
- **Li Z, Liu J, and Zhao Y (2005)** Possible Mechanism Underlying the Antiherpetic Activity of a Proteoglycan Isolated from the Mycelia of *Ganoderma lucidum* in Vitro. Journal of Biochemistry and Molecular Biology,38:34-40.
- **Lull C, Wichers H, Savelkoul H (2005)** Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators inflammm 2:63-80
- **Martinez-Flores, S. González-Gallego, J. Culebras, JM y. Tuñón, M.^a J. 2002.** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Departamento de Fisiología*,

Universidad de León y *Hospital de León. España. Nutr. Hosp. (2002) XVII (6) 271-278 ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ S.V.R. 318

- **Merck (1980)** Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Darmstadt, Germany.
- **Mesa-Arango AC, Bueno-Sanchez JG, y. Betancur-Galvis LA. (2004)** Productos naturales con actividad antimicótica. Revista especializada Quimioterapia, 17:325-331.
- **MK Tecnoquímicas, 2010.** Disponible en la web: http://www.thomsonplm.com/Diccionarios/Col_PLM37/PLM/productos/47192.htm. Última visita 20 de mayo de 2010.
- **Modak, B. Arrieta, A. Torres, R y Urzua, A. 2002.** Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*, efecto del tipo de estructura. Bol. Soc. Chil. Quim. 47 (1); 19 – 23.
- **Moellering RC, Graybill JR, Mc Gowan JE, Corey L. (2007)** Antimicrobial Resistance Prevention initiative-an update: proceedings of an expert panel on Resistance. The American Journal of Medicine, 7: 4-25.
- **Moore, E. (1996).** Fundamentals of the fungi. 4th ed. Prentice Hall. New Jersey. 574 Pages
- **Mueller, G, Bills, G, Foster, M. 2004.** Biodiversity of Fungi Inventory And Monitoring Methods. 777 pages
- **Ofodile LN, Uma NU, Kokubun T, Grayer RJ, Ogundipe OT, Simmonds MS. (2005)** Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. Phytotherapy Research, 19:310-313.
- **Paduch R, Szerszeń , Trytek M, and Fiedurek J. (2007)** Terpenes: substances useful in human healthcare. Archives of Immunology, 55: 315–327.
- **Petrikkos G, Skiada A (2007)** Recent advances in antifungal chemotherapy. International Journal Antimicrobial agents, 30: 108-117.
- **Rogers T. (2006)** Antifungal Drug resistance: limited data, dramatic impact. International journal of Antimicrobial agent, 7-11.
- **Romero, M & Zarate, A. 2009.** Optimización de un medio de cultivo para de biomasa y compuestos fenolicos a partir de una cepa de *Ganoderma lucidum* a escala de laboratorio. Tesis Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 40 pp.
- **Ruiz J (2001)** El asombroso reino de los hongos. Avance y perspectiva 20: 275-281
- **Russell R, Paterson M (2006)** Ganoderma-A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry, 67:1985-2001.
- **Santafé, G & Zuluaga, J. 2007.** Búsqueda de compuestos bioactivos en los hongos de la familia Ganodermataceae del departamento de Córdoba. Universidad de Córdoba facultad de ciencias básicas e ingeniería. Departamento de química. 22 pp.

- **Schmid I, Sattler I, Grabley S, Thiericke R (1999)** Natural Products in High Throughput Screening: Automated High-Quality Simple Preparation. *Journal of Biomolecular Screening* 4: 15-25
- **Schübler, A.; Schwarzott, D. & Walker, C. 2001.** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 102(12): 1413-1421.
- **Sherma J & Bernard F. (1996).** *Handbook of Thin Layer Chromatography*, 2da edición Ed. Marcel-Dekker.
- **Trigos-Landa Á; 2000.** Química de los hongos. En “producción de la vitamina D₂ a partir de Hongos Macromicetos: Aspectos Científicos, Técnicos y Económicos”; Editorial Guadalupe. Pág. 34-36.
- **Vovk, I, Simonovska, B, Vuorela, H. 2005.** Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. *Journal of Chromatography A.*, Volume 1077, Pages 188–194
- **VIVOT, E; MASSA, R; CRUAÑES, M; MUÑOZ, J; FERRARO, G; GUTKIND, G & MARTINO, M .2007.** Actividad Antimicrobiana *In Vitro* de Seis Especies Autóctonas de la Flora de Entre Ríos (Argentina). *Latin American Journal of Pharmacy* (formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*) *Lat. Am. J. Pharm.* **26** (4): 563-6
- **Verpoorte R (1998)** Exploration of nature’s chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today* 3: 323-238
- **Wang H, Ng TB (2005)** Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*.
- **Yi- Lu Q, Sartippour, Brooks M, Zhang, Q, Hardy M, Liang-go V, Li F, Heber D (2004)** *Ganoderma lucidum* spore extract inhibits endothelial and breast cancer cell in vitro. *Oncology reports* 12: 652-662.
- **Zjawiony JK (2004).** Biologically active compounds from aphylllophorales (polypore) fungi. *Journal of natural products*, 67: 300-310.
- **Zuluaga, J; Perez, C; Angulo, A; Torres, O & Santafé, G. 2007.** Química y actividades antioxidantes y bactericidas del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. *Scientia et technica*. Abril. Año XIII. Numero 0033. Universidad tecnológica de Pereira Colombia. 329-332 pp.

10. ANEXOS

ANEXO 10.1. Fotografías del *Ganoderma lucidum*

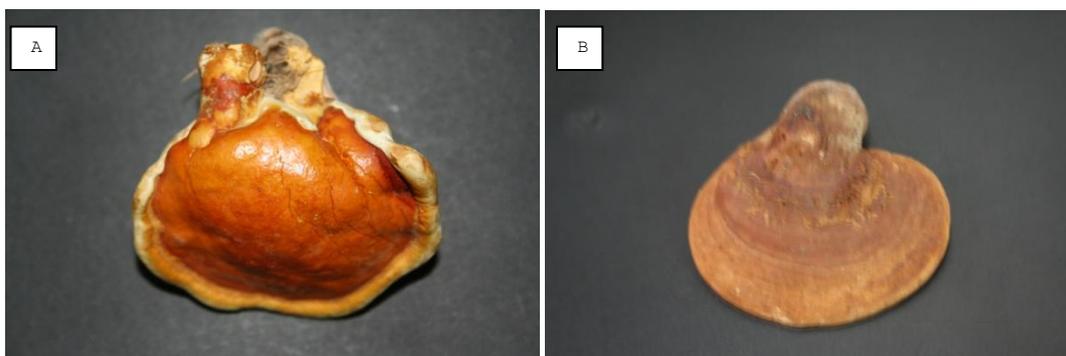


Figura 4. A. Cuerpo fructífero *Ganoderma lucidum* inmaduro (sin esporular). B. Cuerpo fructífero *Ganoderma lucidum* maduro (esporulado), foto tomada por Niño-Arias, 2010.



Figura 5. Montaje para producción de micelio producido en medio líquido de *Ganoderma lucidum*, foto tomada por Niño-Arias, 2010.

ANEXO 10.2. Medios de cultivo.

ANEXO 10.2.1 Medio de cultivo líquido optimizado para *Ganoderma lucidum* por Romero & Zarate en 2009.

MEDIO BASE	
	Concentración (g/L)
Cloruro de amonio	2
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .H ₂ O	0,5
Clorafenicol	0,1

MEDIO PRE-DICHO			
Aceite de oliva (%v/v)	4.04	Aceite de oliva(mL)	64,64
Extracto de carne (g/L)	17.46	Extracto de carne (g)	27,93
Sacarosa (g/L)	50	Sacarosa (g)	80

ANEXO 10.2.2 Cálculos y preparación de Medios de cultivo utilizados para esporulación Agar avena y para montaje de prueba Muller – Hinton.

MEDIO HARINA DE AVENA	
Componentes	Cantidad (g/L)
Harina de avena	20
Agar bacteriológico	15
Indicaciones	
Disolver la harina de avena y el agar bacteriológico y aforar a un litro con agua destilada calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.	

MEDIO MULLER HINTON MODIFICADO 2 % GLUCOSA	
Componentes	Cantidad (g/L)
Glucosa	20
Azul de metileno	100 µL por litro
Peptona de caseína	17,5
Almidón	1,5
Extracto de carne	4
Agar-agar	15
Indicaciones	
Disolver la glucosa, peptona de caseína, almidón, extracto de carne y el agar agar, aforar a un litro con agua destilada calentar hasta ebullición, agregar el azul de metileno, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.	

ANEXO 10.3 Tabla 2. Pesos y concentraciones de cada uno de los extractos evaluados.

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO CON SOLVENTE(g/mL)
M1-1	0,261
M1-2	0,119
M1-3	0,328
M1-4	0,562
M1-5	0,054
M1-6	0,256
M1-7	0,015
M1-8	0,011
M1-9	0,171
M2.1	0,387
M2-2	0,064
M2-3	0,229
M2-4	0,277
M2-5	0,057
M2-6	0,207
M2-7	0,055
M2-8	0,014
M2-9	0,236

M3-1	0,678
M3-2	0,155
M3-3	0,131
M3-4	0,092
M3-5	0,059
M3-6	0,018
M3-7	0,017
M3-8	0,010
M3-9	0,054
M4-2	0,651
M4-3	0,083
M4-4	0,083

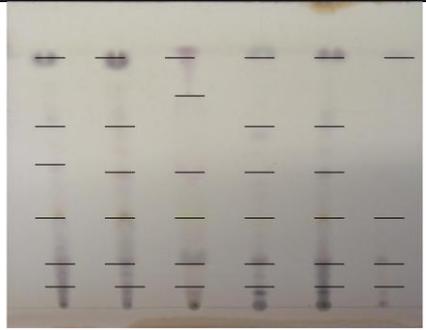
ANEXO 10.4. Tabla 3. Reveladores utilizados para evidenciar grupos funcionales

Revelador y grupo funcional identificado	Tratamiento post-aspersión	Visualización	Fundamento de la reacción	Referencia
Vainillina (Alcoholes, fenoles, esteroides, aceites esenciales)	Calentar la placa a 100-120°C hasta obtener mayor intensidad de color de bandas	Luz visible		Merck 1980
Cloruro de antimonio (III) (terpenoides)	Calentar la placa a 100°C por 5 minutos	Luz UV de onda larga, las bandas se observan de color amarillo rojizo a azul-violeta	El cloruro de antimonio (III) forma complejos P (coloreados) con los sistemas de dobles enlaces	Merck 1980
Rectivo de Neu (Flavonoides)	-	Luz UV de onda larga las bandas se observan de color amarillo a rojo. Si hay cumarinas estas se observan como bandas azules.	El ácido difenilbórico 2-aminoetil ester reacciona para formar complejos con las 3-hydroxyflavonas, cambiando la máxima absorción. longitud de onda de	Jork et al. 1990
Hidroxido de potasio (cumarinas)		Luz visible y luz UV de onda larga		Merck 1980
Hidroxilamina - Cloruro ferrico (Lactonas)		Luz visible		Merck 1980

Dinitrofenil hidrazina (Aldehídos libres, Cetonas)	Calentar la placa a 110°C por 10 a 20 mins.	Luz visible. Los aldehídos se observan como bandas de color verde olivo y las cetonas azules.	La 2,4-dinitrofenil hidrazina reacciona con las aldosas y cetosas generando osazonas coloreadas.	Jork et al. 1990 y Merck 1980
Anisaldehído (modificado para glucósidos)	Calentar la placa a 100°C hasta obtener mayor intensidad de color en las bandas	Luz visible y luz UV de onda larga	Los cationes ciclopentenílicos de los glucósidos se condensan con el anisaldehído y forman compuestos coloreados	Jork et al. 1990 y Merck 1980

ANEXO 10.5 Cromatografías (reveladores genéricos y específicos). La letra a) en todas las fotos muestra la distancia recorrida por la fase móvil utilizada.

ANEXO 10.5.1

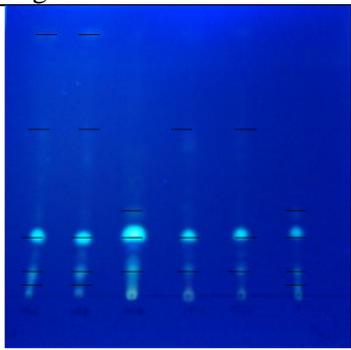
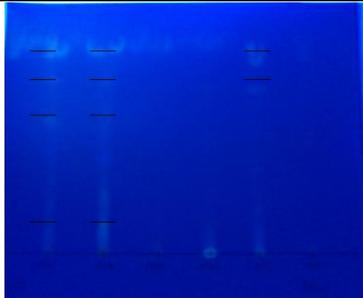
Revelador	Muestra	Fotografía	Rf
Vainillina (alcoholes, esteroides, fenoles y aceites esenciales)	Bencina de petróleo (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L.)		Rf ₁ = 0,053
	Fase móvil: Hexano - Acetona (9:1)		Rf ₂ =0,18
			Rf ₃ =0,21
	CH ₂ Cl ₂ (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L.)		Fase móvil: Cloroformo - AcOEt (7:3).
		Rf ₅ =0,56	
		Rf ₆ =0,64	
		Rf ₇ =0,77	
	AcOEt (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L.)	Fase móvil: Cloroformo - MetOH (9:1)	Rf ₈ = 0,90
			Rf ₁ = 0,27
			Rf ₂ =0,45
			Rf ₃ =0,53
	Hidroalcoholica (de izq-der: Hidroalcoholica M1, Hidroalcoholica M2 y Hidroalcoholica M3)	Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)	Rf ₄ =0,63
Rf ₅ =0,69			
Rf ₆ =0,75			
Rf ₇ = 0,83			
Caldo (De izq-der, fase bencina de petróleo, fase de diclorometano, fase de AcOEt y fase Caldo)	Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)	Rf ₈ =0,91	
		Rf ₁ = 0,37	
		Rf ₂ =0,42	
		Rf ₃ =0,78	
Hidroalcoholica (de izq-der: Hidroalcoholica M1, Hidroalcoholica M2 y Hidroalcoholica M3)	Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)	Rf ₄ =0,89	
		Rf ₁ = 0,38	
		Rf ₂ =0,48	
		Rf ₃ =0,65	
Caldo (De izq-der, fase bencina de petróleo, fase de diclorometano, fase de AcOEt y fase Caldo)	Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)	Rf ₄ =0,71	
		Rf ₁ = 0,12	
		Rf ₂ =0,55	
		Rf ₃ =0,88	
Hidroalcoholica (de izq-der: Hidroalcoholica M1, Hidroalcoholica M2 y Hidroalcoholica M3)	Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)	Rf ₄ =0,93	
		Rf ₁ = 0,12	
		Rf ₂ =0,55	
		Rf ₃ =0,88	
Caldo (De izq-der, fase bencina de petróleo, fase de diclorometano, fase de AcOEt y fase Caldo)	Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)	Rf ₄ =0,96	
		Rf ₁ = 0,12	
		Rf ₂ =0,55	
		Rf ₃ =0,88	

ANEXO10.5.2

Revelador	Muestra	Fotografía	Rf
Cloruro de antimonio (III) (Terpenoides)	<p>Bencina de petróleo (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L.</p>		Rf ₁ = 0.05
			Rf ₂ = 0.1
			Rf ₃ = 0.12
			Rf ₄ = 0.21
			Rf ₅ = 0.35
			Rf ₆ = 0.47
			Rf ₇ = 0.64
			Rf ₈ = 0,74
			Rf ₉ = 0.84
			Rf ₁₀ = 0.96
Cloruro de antimonio (III) (Terpenoides)	<p>CH₂Cl₂ (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - AcOEt (7:3).</p>		Rf ₁ = 0.58
			Rf ₂ = 0.66
			Rf ₃ = 0.70
			Rf ₄ = 0.77
			Rf ₅ = 0,87
			Rf ₆ = 0,97
Cloruro de antimonio (III) (Terpenoides)	<p>AcOEt (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - MetOH (9:1)</p>		Rf ₁ = 0.35
			Rf ₂ = 0.46
			Rf ₃ = 0,61
			Rf ₄ = 0,72
			Rf ₅ = 0,85
			Rf ₆ = 0,96

<p>EtOH biomasa (de izq-der, EtOH -biomasa- M1, EtOH- biomasa- M2 y EtOH- biomasa- M3)</p> <p>Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)</p>		$Rf_1 = 0.78$
		$Rf_2 = 0.84$
		$Rf_3 = 0.91$
		$Rf_4 = 0.95$
Hidroalcoholica	No revelo nada	-
<p>Crudo</p>		$Rf_1 = 0.73$
		$Rf_2 = 0.82$
		$Rf_3 = 0.86$

ANEXO 10.5.3

Revelador	Muestra	Fotografía	Rf
Reactivo de Neu (Flavonoides y cumarinas)	Bencina de petróleo (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Hexano - Acetona (9:1)		Rf ₁ = 0.05
			Rf ₂ = 0.11
			Rf ₃ = 0.31
			Rf ₄ = 0.42
			Rf ₅ = 0.63
			Rf ₆ = 0.98
	CH₂Cl₂ (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - AcOEt (7:3).		Rf ₁ = 0,73
			Rf ₂ = 0.82
			Rf ₃ = 0.96
	AcOEt (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - MetOH (9:1)		Rf ₁ = 0.11
			Rf ₂ = 0.61
			Rf ₃ = 0.83
			Rf ₄ = 0.93
	EtOH biomasa (de izq-der, EtOH - biomasa-M1, EtOH-biomasa- M2 y EtOH-biomasa- M3) Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)		Rf ₁ = 0,59
			Rf ₂ = 0.68
			Rf ₃ = 0.80
Rf ₄ = 0.94			
Hidroalcohólica	No revelo nada	-	
Caldo	No revelo nada	-	

ANEXO 10.5.4

Revelador	Muestra	Fotografía	Rf
Hidróxido de potasio (Cumarinas)	Bencina de petróleo (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Hexano – Acetona (9:1)		Rf ₁ = 0.09 Rf ₂ = 0.82
	CH₂Cl₂ (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - AcOEt (7:3).		Rf ₁ = 0.11 Rf ₂ = 0.17 Rf ₃ = 0,31 Rf ₄ = 0,90
	AcOEt (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - MetOH (9:1)		Rf ₁ = 0,10
	EtOH biomasa (de izq-der, EtOH -biomasa- M1, EtOH- biomasa- M2 y EtOH- biomasa- M3) Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)		Rf ₁ = 0.55 Rf ₂ = 0.63
	Hidroalcohólica	No revelo nada	-
	Caldo	No revelo nada	-

ANEXO 10.5.5

Revelador	Muestra	Fotografía	Rf
Hidroxilamina cloruro férrico (lactonas)	Bencina de petróleo (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Hexano – Acetona (9:1)		Rf ₁ = 0.09
	CH₂Cl₂ (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - AcOEt (7:3).		Rf ₁ = 0.04 Rf ₂ = 0.28 Rf ₃ = 0.46 Rf ₄ = 0.82 Rf ₅ = 0.93
	AcOEt (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - MetOH (9:1)		Rf ₁ = 0.13 Rf ₂ = 0.17 Rf ₃ = 0.24 Rf ₄ = 0.32 Rf ₅ = 0.48 Rf ₆ = 0.85 Rf ₇ = 0.94
	EtOH biomasa (de izq-der, EtOH – biomasa-M1, EtOH-biomasa- M2 y EtOH-biomasa- M3) Fase móvil: Cloroformo – MetOH (1:1)		Rf ₁ = 0.89
	Hidroalcohólica	No revelo nada	-
	Caldo	No revelo nada	-

ANEXO 10.5.6

Revelador	Muestra	Fotografía	Rf
Dinitrofenil hidracina (cetonas y aldehídos libres)	Bencina de petróleo (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Hexano - Acetona (9:1)		Rf ₁ = 0.11 Rf ₂ = 0.14 Rf ₃ = 0.15 Rf ₄ = 0.21 Rf ₅ = 0.46 Rf ₆ = 0.53 Rf ₇ = 0,9
	CH₂Cl₂ (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - AcOEt (7:3).		Rf ₁ = 0.08 Rf ₂ = 0.15 Rf ₃ = 0.2 Rf ₄ = 0.28 Rf ₅ = 0.68 Rf ₆ = 0.78 Rf ₇ = 0.96
	AcOEt (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L. Fase móvil: Cloroformo - MetOH (9:1)		Rf ₁ = 0.79 Rf ₂ = 0.87
	EtOH biomasa (de izq-der, EtOH - biomasa-M1, EtOH-biomasa- M2 y EtOH-biomasa- M3) Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)		Rf ₁ = 0.88
	Hidroalcohólica	No revelo nada	-
Caldo	No revelo nada	-	

ANEXO 10.5.7

Revelador	Muestra	Fotografía	Rf
Anisaldehído (glucósidos)	Bencina de petróleo (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L). Fase móvil: Hexano - Acetona (9:1)		Rf ₁ = 0.13
			Rf ₂ = 0.45
			Rf ₃ = 0.52
			Rf ₄ = 0.76
			Rf ₅ = 0.89
			Rf ₆ = 0.95
	CH₂Cl₂ (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L). Fase móvil: Cloroformo - AcOEt (7:3).		Rf ₁ = 0.44
			Rf ₂ = 0.63
			Rf ₃ = 0.75
			Rf ₄ = 0.94
	AcOEt (Muestras de izq-der, M1 seriado biomasa, M2 seriado biomasa, M3 seriado biomasa, M1 seriado L-L, M2 seriado L-L y M3 seriado L-L). Fase móvil: Cloroformo - MetOH (9:1)		Rf ₁ = 0.39
			Rf ₂ = 0.62
Rf ₃ = 0.8			
Rf ₄ = 0.92			
	EtOH biomasa	No revelo nada	-
	Hidroalcohólica	No revelo nada	-
	Caldo (De izq-der, fase bencina de petróleo, fase de diclorometano, fase de AcOEt y fase Caldo) Fase móvil: Cloroformo - MetOH (1:1)		Rf ₁ = 0.48
			Rf ₂ = 0.72

ANEXO 10.6

Tabla 4. Comparación fotográfica de los resultados (Extracto, control terbinafina y control de crecimiento).

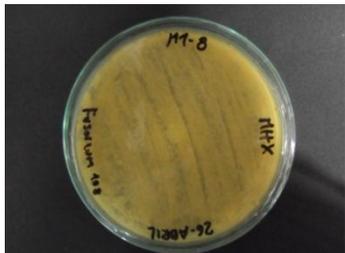
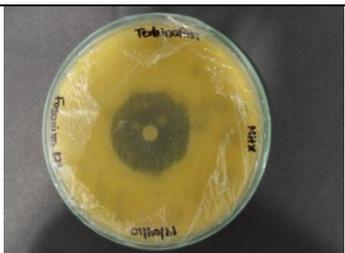
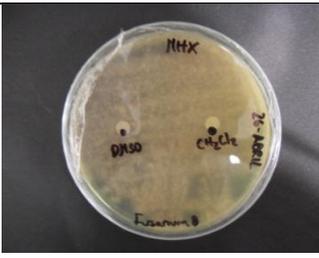
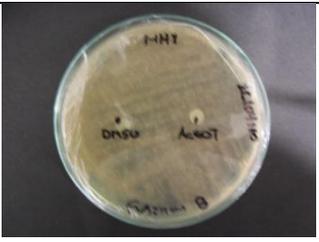
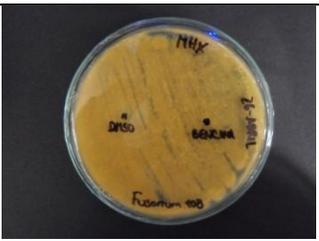
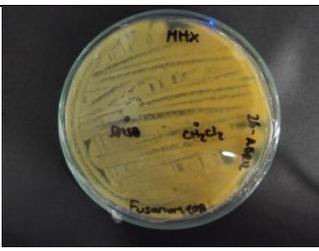
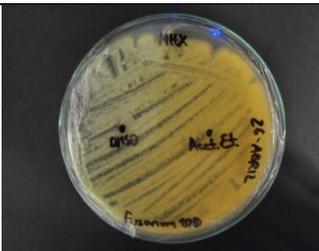
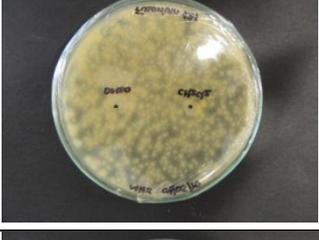
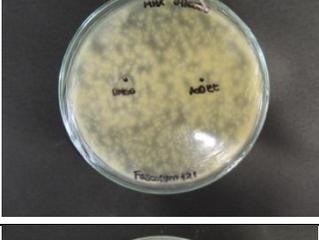
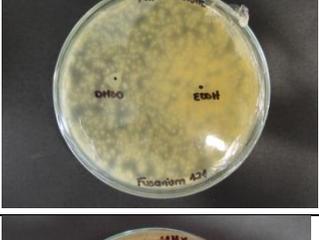
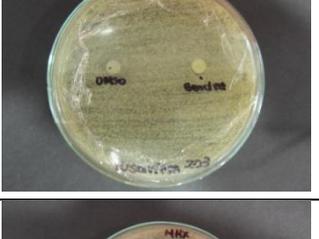
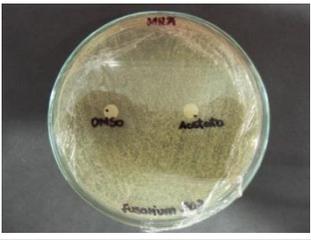
Hongo	Foto representativa de un extracto	Control con terbinafina	Control crecimiento
Fusarium 8			
Fusarium 108			
Fusarium 121			
Fusarium 203			

Tabla 5. Control de solventes y DMSO.

Hongo	Control Solventes y DMSO	Fotografía
<i>Fusarium 8</i>	Bencina de petróleo y DMSO	
	CH₂Cl₂ y DMSO	
	AcOEt y DMSO	
	EtOH y DMSO	
<i>Fusarium 108</i>	Bencina de petróleo y DMSO	
	CH₂Cl₂ y DMSO	
	AcOEt y DMSO	

	EtOH y DMSO	
<i>Fusarium 121</i>	Bencina de petróleo y DMSO	
	CH ₂ Cl ₂ y DMSO	
	AcOEt y DMSO	
	EtOH y DMSO	
<i>Fusarium 203</i>	Bencina de petróleo y DMSO	
	CH ₂ Cl ₂ y DMSO	

	AcOEt y DMSO	 A petri dish containing a bacterial culture on agar. Two small white spots are visible on the surface of the agar. The spot on the left is labeled 'DMSO' and the spot on the right is labeled 'AcOEt'. The petri dish lid has 'M17' written on it and 'Fuzantion 203' is visible at the bottom.
	EtOH y DMSO	 A petri dish containing a bacterial culture on agar. Two small white spots are visible on the surface of the agar. The spot on the left is labeled 'DMSO' and the spot on the right is labeled 'EtOH'. The petri dish lid has 'M17' written on it and 'Fuzantion 203' is visible at the bottom.

Anexo 10.7

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA - PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable:		Melba Linares Linares	
Número CDM-PUJ		24 (8)	
Microorganismo		Fusarium sp	
Fuente		Origen Humano	Aislado de Uña de pie
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar		
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 3-5 días.	
Pruebas biológicas		<p align="center">Características morfológicas</p> <p>Características Macroscópicas: crecimiento rápido (3-5 días) Anverso: color morado Reverso: color morado y blanco Textura: algodonosa, micelio aéreo Aspecto: radial</p> <p>Características Microscópicas: las células conidiógenas están aisladas o agrupadas en esporodocios. Macroconidios curvados, pluriseptados. Microconidios unicelulares, elipsoidales, fusiformes. hialino</p>	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión Período de incubación Enfermedades que produce	Persona-Persona Lesiones, traumatismos 3-5 días <i>Onicomycosis, Queratitis, lesión cutánea localizada, Micetoma, Endocarditis.</i>	
Medidas de protección/Manipulación		<ul style="list-style-type: none"> - EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado 	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: <ul style="list-style-type: none"> - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación. 	

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA - PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA - PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable:		Melba Linares Linares	
Número CMDM-PUJ		21 (108)	
Microorganismo		Fusarium sp	
Fuente		Origen Animal	Aislado de lesión de ojo de vaca
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar		
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 3-5 días.	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
		<p>Características Macroscópicas: crecimiento rápido (3-5 días) Anverso: color café a amarillo Reverso: color blanco Textura: algodonosa, micelio aéreo Aspecto: radial</p> <p>Características Microscópicas: las células conidiógenas están aisladas o agrupadas en esporodocios. Macroconidios curvados, pluriseptados. Microconidios unicelulares, elipsoidales, fusiformes. hialino</p>	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión Período de incubación Enfermedades que produce	Persona-Persona Lesiones, traumatismos 3-5 días <i>Onicomycosis, Queratitis, lesión cutánea localizada, Micetoma, Endocarditis.</i>	
Medidas de protección/Manipulación		<ul style="list-style-type: none"> - EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado 	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: <ul style="list-style-type: none"> - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación. 	

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA - PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA

Responsable:		Melba Linares Linares	
Número CDM-PUJ		22 (121)	
Microorganismo		<i>Fusarium sp</i>	
Fuente		Origen Animal	animal
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar		
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 3-5 días.	
Pruebas biológicas		<p style="text-align: center;">Características morfológicas</p> <p>Características Macroscópicas: crecimiento rápido (3-5 días) Anverso: color rojo oscuro Reverso: color amarillo verdoso a rojo claro Textura: algodonosa Aspecto: radial</p> <p>Características Microscópicas: las células conidiógenas están aisladas o agrupadas en esporodoquios. Macroconidios curvados, pluriseptados. Microconidios unicelulares, elipsoidales, fusiformes. hialino</p>	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión Período de incubación Enfermedades que produce	Persona-Persona Lesiones, traumatismos 3-5 días <i>Onicomycosis, Queratitis, lesión cutánea localizada, Micetoma, Endocarditis.</i>	
Medidas de protección/Manipulación		<ul style="list-style-type: none"> - EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado 	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: <ul style="list-style-type: none"> - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación. 	

Responsable:		Melba Linares Linares	
Número CMDM-PUJ		23 (203)	
Microorganismo		<i>Fusarium sp</i>	
Fuente		Origen Humano	Aislado de lesión queratitis
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar		
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 3-5 días.	
Pruebas biológicas		<p align="center">Características morfológicas</p> <p>Características Macroscópicas: crecimiento rápido (3-5 días) Anverso: color morado claro a amarillo crema Reverso: color morado y blanco Textura: algodonosa, micelio aéreo Aspecto: radial</p> <p>Características Microscópicas: las células conidiógenas están aisladas o agrupadas en esporodoquios. Macroconidios curvados, pluriseptados. Microconidios unicelulares, elipsoidales, fusiformes. hialino</p>	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión Período de incubación Enfermedades que produce	Persona-Persona Lesiones, traumatismos 3-5 días <i>Onicomycosis, Queratitis, lesión cutánea localizada, Micetoma, Endocarditis.</i>	
Medidas de protección/Manipulación		<ul style="list-style-type: none"> - EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado 	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: <ul style="list-style-type: none"> - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación. 	