



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DETERMINACIÓN  
DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO  
FÚNGICO DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Cordyceps*”**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: LUIS JOSUÉ QUISHPE COELLO**

**DIRECTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA. MSc.**

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Luis Josué Quishpe Coello

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, LUIS JOSUÉ QUISHPE COELLO, declaro que el presente trabajo de integración curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de integración curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

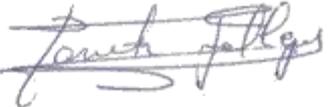
Riobamba, 06 de octubre de 2022



**Luis Josué Quishpe Coello**  
**160052885-3**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, “**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO FÚNGICO DE UNA ESPECIE DEL GÉNERO *Cordyceps.***”, realizado por el señor **LUIS JOSUÉ QUISHPE COELLO**, ha sido revisado minuciosamente por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos, científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Bqf. Gisela Alexandra Pilco Bonilla. Msc. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2022-10-06
Bqf. Diego Renato Vinueza Tapia. Msc. <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2022-10-06
Dra. Janneth María Gallegos Núñez. <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>		2022-10-06

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme llegar hasta este punto, por darme la vida, su amor, respaldo y sus bendiciones en cada paso que doy para lograr mis objetivos.

El presente trabajo de grado se lo dedico a mis padres Fernando y Violeta quienes me han brindado el apoyo incondicional durante todo el ciclo académico, su amor y valores día a día para llegar a cumplir cada meta propuesta. Su amor, paciencia, consejos han sido el pilar fundamental en este camino llamado vida. A mis hermanos Jorge y Fernando por permanecer a mi lado y apoyarme en cada paso frente a cada adversidad han sido un pilar de fortaleza que han motivado seguir adelante a cumplir los objetivos planteados. A todos mis familiares y amigos que me han brindado toda su amistad y apoyo en cada momento.

Josué

## **AGRADECIMIENTO**

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser los forjadores de profesionales.

A la Facultad de Ciencias y Escuela de Bioquímica y Farmacia por acogerme en sus filas de enseñanza y formación profesional.

Al Bqf. Diego Vinueza. Msc por su asesoramiento en la dirección del Trabajo de Integración Curricular, por sus conocimientos que han permitido la culminación de mi trabajo.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación.

Josué

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4

### CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Antecedentes.....	5
1.2. Bases teóricas.....	6
1.2.1. Micología.....	6
1.2.2. Los hongos y la medicina tradicional.....	7
1.2.3. Especies de Hongos estudiados.....	7
1.2.4. Género <i>Cordyceps</i> .....	8
1.2.5. <i>Cordyceps</i> .....	9
1.2.6. Hospedadores.....	11
1.2.7. Técnicas de extracción de drogas.....	11
1.2.8. Tipos de Extractos.....	12
1.2.9. Estudio Farmacognóstico.....	12
Tamizaje Fitoquímico.....	12
Identificación de Compuestos Químicos- Metabolitos Secundarios.....	12
1.2.10. Métodos cromatográficos.....	13
Cromatografía en columna.....	13
Cromatografía capa fina.....	13
1.2.11. Espectrofotometría Infrarroja (IR).....	13
1.2.12. Microorganismos de Ensayo.....	14
1.2.13. Método de difusión en disco en medio sólido.....	14
1.2.14. Antibióticos.....	15

## CAPÍTULO II

<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	16
<b>2.1. Lugar de desarrollo de la investigación</b> .....	16
<b>2.2. Tipo y diseño de investigación</b> .....	16
<b>2.3. Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo de la muestra</b> 16	
<b>2.4. Hipótesis</b> .....	17
<b>Hipótesis general</b> .....	17
<b>Hipótesis nula</b> .....	17
<b>Hipótesis alternativa</b> .....	17
<b>2.5. Identificación de las variables</b> .....	17
<b>2.6. Metodología</b> .....	18
<b>2.6.1. Toma de muestras del material biológico</b> .....	18
<b>2.6.2. Comprobación e Investigación taxonómica</b> .....	19
<b>2.6.3. Estudio morfológico</b> .....	19
<b>2.6.4. Aislamiento y cultivo de <i>Cordyceps</i></b> .....	19
<b><i>Aislamiento de Cordyceps</i></b> .....	19
<b><i>Cultivo de Cordyceps</i></b> .....	20
<b>2.6.5. Estudio cualitativo de metabolitos secundarios</b> .....	21
<b>2.6.6. Elaboración del extracto alcohólico de <i>Cordyceps</i></b> .....	26
<b>2.6.7. Separación cromatográfica</b> .....	27
<b>2.6.8. Control del extracto</b> .....	27
<b>2.6.9. Ensayo de Actividad Antimicrobiana</b> .....	29
<b>2.7. Materiales, equipos y reactivos</b> .....	31

## CAPÍTULO III

<b>3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	35
<b>3.1. Cultivo de <i>Cordyceps</i></b> .....	35
<b>Taxonomía del hospedador, insecto del orden Orthoptera</b> .....	35
<b>Taxonomía de la especie fúngica del género <i>Cordyceps</i></b> .....	35
<b>Aislamiento y purificación de <i>Cordyceps</i></b> .....	40
<b>Morfología microscópica de <i>Cordyceps</i></b> .....	41
<b>Cultivo de <i>Cordyceps</i> en sustrato sólido</b> .....	43
<b>3.2. Propiedades físicas, control de extractos de <i>Cordyceps</i></b> .....	45
<b>3.3. Análisis de la composición química de la droga cruda de <i>Cordyceps</i></b> .....	47
<b>3.3.1. Tamizaje fitoquímico</b> .....	47

<b>3.3.2. Identificación de grupos funcionales en <i>Cordyceps</i></b> .....	48
<b>3.4. Resultados de Actividad Antimicrobiana del extracto de <i>Cordyceps</i></b> .....	48
<b>3.4.1. Evaluación de fracciones obtenidas por cromatografía en columna</b> .....	48
<b>3.4.2. Inhibición frente a cepas bacterianas</b> .....	50
<b>CONCLUSIONES</b> .....	53
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	54

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b> Lugar de procedencia de <i>Cordyceps</i> .....	18
<b>Tabla 2-2:</b> Composición del medio base para crecimiento de <i>Cordyceps</i> .....	20
<b>Tabla 1-3:</b> Taxonomía del hospedador.....	35
<b>Tabla 2-3:</b> Taxonomía de la especie fúngica del género <i>Cordyceps</i> .....	39
<b>Tabla 3-3:</b> Resultados de las propiedades físicas, control de extractos de <i>Cordyceps</i> .....	45
<b>Tabla 4-3:</b> Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios del extracto metanólico de <i>Cordyceps</i> . .....	47
<b>Tabla 5-3:</b> Análisis espectrofotométrico infrarrojo del micelio de <i>Cordyceps</i> .....	48
<b>Tabla 6-3:</b> Reporte de cromatográfico .....	50
<b>Tabla 7-3:</b> Resultados de Actividad Antimicrobiana mediante Método de difusión en discos. 50	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Esquema del proceso de infección de un hongo entomopatógeno.....	9
<b>Figura 2-1:</b> <i>Cordyceps sinensis</i> Habitat natural.....	10
<b>Figura 3-1:</b> <i>Cordyceps sinensis</i> Ciclo de vida.....	10
<b>Figura 4-1:</b> <i>Cordyceps militaris</i> .....	10
<b>Figura 5-1:</b> Saltamontes Orthoptera: Tettigoniidae.....	11
<b>Figura 1-2:</b> Platilla utilizada para la colocación de sensidiscos.....	31
<b>Figura 1-3:</b> Microscopía de <i>Cordyceps militaris</i> .....	36
<b>Figura 2-3:</b> Cuerpos fructíferos de especie fúngica en estudio.....	36
<b>Figura 3-3:</b> Peritecio de especie fúngica en estudio.....	36
<b>Figura 4-3:</b> Ascosporas en superficie del peritecio.....	37
<b>Figura 5-3:</b> Especies de <i>Cordyceps</i> en Ecuador.....	37
<b>Figura 6-3:</b> Insecto infectado por <i>Cordyceps fungus</i> .....	38
<b>Figura 7-3:</b> Especie de hongo encontrado del género <i>Cordyceps</i> en un hospedador Tettigoniidae.....	39
<b>Figura 8-3:</b> Aislamiento de <i>Cordyceps</i> .....	40
<b>Figura 9-3:</b> <i>Cordyceps</i> en PDA. Crecimiento micelial en 8 días.....	40
<b>Figura 10-3:</b> <i>Cordyceps</i> en PDA. Crecimiento micelial en 30 días.....	41
<b>Figura 11-3:</b> <i>Cordyceps</i> tinción azul de lactofenol, lente 40X.....	42
<b>Figura 12-3:</b> Ascosporas fragmentadas del hongo <i>Cordyceps</i> , lente 100X.....	42
<b>Figura 13-3:</b> Ascospora y conidio del hongo <i>Cordyceps</i> , lente 40X.....	42
<b>Figura 14-3:</b> Cultivo de <i>Cordyceps</i> en medio sólido.....	43
<b>Figura 15-3:</b> Cultivo de <i>Cordyceps</i> .....	44
<b>Figura 16-3:</b> Cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto de <i>Cordyceps</i> .....	49

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfica 1-2:</b> Preparación del extracto de <i>Cordyceps</i> para el análisis de metabolitos secundarios	22
<b>Gráfica 2-2:</b> Reacciones cualitativas para identificación de metabolitos secundarios.....	1
<b>Gráfica 1-3:</b> Porcentaje de rendimiento en la extracción en metanol. ....	46
<b>Gráfica 2-3:</b> Diámetro de inhibición formado para <i>E. coli</i> con respecto a la concentración del extracto de <i>Cordyceps</i> .....	51
<b>Gráfica 3-3:</b> Diámetro de inhibición formado para <i>S. aureus</i> con respecto a la concentración del extracto de <i>Cordyceps</i> .....	52
<b>Gráfica 4-3:</b> Diámetro de inhibición formado para <i>S. aureus</i> con respecto a la concentración del extracto de <i>Cordyceps</i> .....	52

## ÍNDICE DE ANEXOS

**ANEXO A:** RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO

**ANEXO B:** ESTRUCTURAS FÚNGICAS DE HONGO *CORDYCEPS*

**ANEXO C:** CULTIVO DE *CORDYCEPS*

**ANEXO D:** MICROSCOPIA DE *CORDYCEPS*

**ANEXO E:** MICELIO DE *CORDYCEPS*

**ANEXO F:** MÉTODO DE SECADO Y MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS

**ANEXO G:** DETERMINACIÓN DEL PH Y FILTRACIÓN DEL EXTRACTO DE  
*CORDYCEPS*

**ANEXO H:** ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA

**ANEXO I:** TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

**ANEXO J:** CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LAS FRACCIONES ACTIVAS DEL  
EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *CORDYCEPS*

**ANEXO K:** MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

**ANEXO L:** ESPECTRO INFRARROJO DEL MICELIO DE *CORDYCEPS*

**ANEXO M:** ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA PROTEÍNA CSAP DE *CORDYCEPS*  
*SINENSIS*

## INDICE DE ABREVIATURAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PDA	Agar de papa y dextrosa
nm	Nanómetros
atm	Atmósfera
pH	Potencial de hidrógeno
UV	Radiación ultravioleta
EtOAc	Acetato de etilo
HCl	Ácido clorhídrico
NaCl	Cloruro de sodio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnesio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotásico
FeCl <sub>3</sub>	Cloruro Férrico
p/v	Porcentaje peso/volumen
v/v	Porcentaje volumen/volumen
g	Gramos
mcg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mm	Milímetros
cm	Centímetros
mL	Mililitros
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo analizar la composición química y determinar la actividad antimicrobiana del extracto fúngico de una especie del género *Cordyceps*. Para dicho estudio se cultivó la especie fúngica del género *Cordyceps* procedente del Parque Etno-Botánico OMAERE de la ciudad del Puyo, provincia de Pastaza. Se trabajó con los micelios obtenidos mediante el cultivo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Se elaboró un extracto de *Cordyceps* con la técnica de maceración de micelios secos y pulverizados en medio alcohólico. El extracto fue evaluado mediante el Método de difusión en discos a concentraciones: 2000, 1000 y 500 µg/mL respectivamente. Se realizaron antibiogramas en Agar Mueller Hinton sobre dos bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con estándar 0,5 McFarland, incubadas a 35 °C en un tiempo de 18 a 24 horas para la observación de la actividad biológica. Esta actividad antimicrobiana se comparó con un control positivo de Cloranfenicol (30 mcg) antibiótico de amplio espectro para bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las concentraciones de mayor efecto antimicrobiano en el extracto alcohólico generaron una mayor inhibición para *Escherichia coli* con un diámetro de inhibición de 9 mm (2500 µg/mL). Los resultados positivos de actividad antimicrobiana se encuentran presentes para las dos cepas bacterianas, sin embargo, dichos halos de inhibición no representan a la media de los antibióticos comerciales. El análisis de la composición química del extracto alcohólico se determinó mediante tamizaje fitoquímico, los grupos biológicos encontrados fueron: alcaloides, triterpenos, lípidos, proteínas y glucósidos cardiotónicos. Se concluye que existe la presencia de grupos funcionales de interés y posible actividad biológica antimicrobiana en los extractos de la especie fúngica del género *Cordyceps*, por lo que se recomienda identificar, cuantificar, separar los metabolitos secundarios presentes mediante la aplicación de técnicas nuevas o complementarias.

**Palabras clave:** <*Cordyceps*>, <HONGO ENTOMOPATÓGENO>, <BACTERIA>, <TAMIZAJE FITOQUÍMICO>, <*Escherichia coli*>, <*Staphylococcus aureus*>, <METABOLITOS SECUNDARIOS>, <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA>, <MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCOS>.

0191-DBRA-UPT-2023



## ABSTRACT

The main objective of this research study was to analyze the chemical composition and determine the antimicrobial activity of the fungal extract of the genus *Cordyceps* species. For this reason, the fungal species of the genus *Cordyceps* were cultivated from the OMAERE Ethno-Botanical Park in the city of Puyo, Pastaza province. The main components were the mycelia obtained by cultivation in the Laboratory of Molecular Biology and Genetics of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. A *Cordyceps* extract was elaborated with the maceration technique of dried and pulverized mycelia in an alcoholic medium compound. The extract was evaluated by the method of diffusion in discs at different concentrations: 2000, 1000, and 500 µg/mL respectively. Antibiofilms were performed on Mueller Hinton Agar on two bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with 0.5 McFarland standard, incubated at 35°C for 18 to 24 hours for the observation of biological activity. This antimicrobial activity was compared with positive control of Chloramphenicol (30 mcg) broad-spectrum antibiotic for Gram-positive and Gram-negative bacteria. The highest antimicrobial effect concentrations in the alcoholic extract generated a higher inhibition for *Escherichia coli* with an inhibition diameter of 9 mm (2500 µg/mL). Positive results of antimicrobial activity were present for both bacterial strains, however, these inhibition halos do not represent the average of commercial antibiotics. The analysis of the chemical composition of the alcoholic extract was determined by phytochemical screening, the biological groups found were: alkaloids, triterpenes, lipids, proteins, and cardiotoxic glycosides. It is concluded that there is the presence of functional groups of interest and possible antimicrobial biological activity in the extracts of the fungal species of the genus *Cordyceps*. It is recommended to identify, quantify, and separate the secondary metabolites present by applying new or complementary techniques.

**Keywords:** <*Cordyceps*>, <ENTHOMOPATHOGENIC FUNGI>, <BACTERIA>, <PHYTOCHEMICAL TAPPING>, <*Escherichia coli*>, <*Staphylococcus aureus*>, <SECONDARY METHABOLITES>, <ANTIMICROBIAL ACTIVITY>, <DISC DIFUSSION METHOD>.



---

Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva  
C.I 0603239070

## INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del problema

Nuestro país Ecuador presenta una mega diversidad a pesar de poseer una pequeña superficie territorial a diferencia de los países vecinos y países del mundo, en el año 1997 Ecuador fue considerado entre los 17 países con mayor diversidad del planeta (Mittermeier et al, 1997: p.390), se establece que por kilómetro cuadrado posee mayor cantidad de especies (García et al, 2014: p.318), su extensión de 256.370 km<sup>2</sup>, presenta el 11% de todas las especies de vertebrados terrestres; 16.087 especies de plantas vasculares y, un aproximado de 600 especies de peces marinos (Bravo, 2014: p.54).

En el país existen 5.172 plantas útiles y tan solo el 60% son usadas por la población con fines medicinales, el inmenso potencial biológico del Ecuador genera un interés por sectores que aprovechan los recursos, la industria farmacéutica ha drenado el saber ancestral-tradicional, los recursos fitoquímicos y genéticos de las plantas con posible valor comercial para llevar al país a generar un patrimonio económico. (De la Torre, 2008: p. 6-8).

Dentro del grupo de especies endémicas y la gran biodiversidad se reconocen (plantas vasculares, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015: p.37), pero no menciona a las especies *fungus*, del latín, que hace referencia a los Hongos (organismos eucariotas que pertenecen al reino Fungi), los hongos se encuentran en nuestro país, y son especies endémicas.

Estos hongos no han sido considerados para investigaciones relevantes de momento, pero presentan una gran diversidad biológica en los ecosistemas del Ecuador, poseen una riqueza química y genética que muy poco ha sido valorada y estudiada para el uso farmacéutico.

En la actualidad el uso de los antibióticos presenta una demanda mundial y su uso inadecuado ha generado la denominada resistencia microbiana (WHO, 2020: p.1), lo que ha llevado a investigadores a extraer nuevos compuestos químicos a partir de plantas endémicas en el Ecuador y el mundo, debido a la escasa fuente de plantas con potencial antimicrobiano, motiva a explorar y realizar estudios etnofarmacológicos en hongos de tipo entomopatógeno para incrementar las fuentes de compuestos químicos con fines terapéuticos.

El objetivo de este proyecto de investigación experimental es realizar un análisis de la composición química y determinar la actividad antimicrobiana del extracto fúngico de una especie del género *Cordyceps*, también promover futuras investigaciones de la riqueza química y genética de hongos entomopatógenos que tiene nuestro país.

Se estableció como hipótesis: El extracto *Cordyceps* contiene metabolitos secundarios de interés para la industria farmacéutica y presenta una actividad antimicrobiana.

## Justificación

Dentro de los ecosistemas multidiversos se encuentran los recursos naturales que son un beneficio para el hombre, entre estos tenemos a especies de hongos, por mucho tiempo han sido utilizados en el control biológico de plagas no deseadas y como fuente de alimento, ya que presentan una variedad de nutrientes y compuestos químicos, por lo que realizar un estudio preliminar de una variedad de hongos entomopatógenos endémicos, permitirá determinar su composición química y posibles usos en la industria farmacéutica (Espinel. C et al, 2018: p.338-342).

*Cordyceps sinensis* es un hongo ascomiceto perteneciente a la familia Clavicipitaceae del orden Hypocreales, es un hongo entomopatógeno altamente valorado en la medicina china durante siglos, entre los componentes químicos únicos presentan: ácido cordicepídico, ácido glutámico, aminoácidos, poliaminas, D-manitol, esteroides, ácido orgánico, nucleósidos, vitaminas del grupo B y hasta 20 minerales (Illana, E, 2007: p. 1-3).

El nucleósido encontrado en *Cordyceps sinensis*, 2',3'dideoxiadenosina (nucleósido comercializado con el nombre de Videx®, bloquea la enzima transcriptasa inversa y es recetada para el tratamiento antirretroviral en pacientes VIH positivo) (Illana, E, 2007: p. 1-3).

Los hongos entomopatógenos se desarrollan a partir de sustratos como los insectos y arácnidos, en sus diferentes estados del ciclo de vida, lo que no solo permite su desarrollo, también le permite obtener diferentes compuestos recolectados en la alimentación propiamente dicha de insectos y arácnidos, como también los compuestos metabolizados y nutrientes presentes en el organismo de cada hospedador, dicha característica permite generar una variedad de metabolitos secundarios (Espinel. C et al, 2018: p. 338-342).

Los componentes químicos de una variedad de hongo entomopatógeno *Cordyceps sinensis* mencionado por (Illana, E, 2007: p. 1-3) pueden ser la base para el estudio y la identificación de estos en una especie endémica del Ecuador.

El hongo entomopatógeno para estudiar procede del Parque Etno-Botánico OMAERE ubicado en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza, el cual será identificado por su taxonomía, se tomará solo una muestra del espécimen (micelio) para no modificar la estructura ecológica del ecosistema de OMAERE, mediante el uso de medios de cultivo específicos para hongos se obtendrá un cultivo axénico y se replicará su crecimiento.

Una vez obtenida una cantidad considerable de materia (micelio – cuerpos fructíferos) se procederá a secar la muestra para realizar una extracción en un disolvente polar, se evaluará la eficiencia del extracto, características fisicoquímicas y se procederá a identificar la composición química, requiriendo el uso de métodos analíticos, la actividad antimicrobiana se determinará mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana a diferentes concentraciones del extracto fúngico.

Para la ejecución del trabajo de investigación experimental propuesto se lo llevará a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), en las instalaciones de los laboratorios de la Facultad de Ciencias, Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorio de Fitoquímica, Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Biología Molecular y Genética.

Los resultados obtenidos en este estudio experimental de la composición química y determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Cordyceps* servirán de referencia para la población académica de la ESPOCH y del Ecuador como base para futuros trabajos de investigación. También permitirá contribuir a la salud pública con el uso de los compuestos bioactivos encontrados en formulaciones farmacéuticas posteriores.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la composición química y determinar la actividad antimicrobiana del extracto fúngico de una especie del género *Cordyceps*.

### **Objetivos específicos**

- Obtener *Cordyceps* mediante medios de cultivo sintéticos y sistematizar su aislamiento/cultivo.
- Obtener el extracto de *Cordyceps* para los análisis a realizar.
- Determinar cualitativamente metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Cordyceps*.
- Determinar la actividad antimicrobiana del extracto de *Cordyceps* mediante el método de difusión en disco en medio sólido aplicado a cepas bacterianas.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

Los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* en el continente asiático, en países como China, Japón y Korea ha tenido mayor relevancia debido a las propiedades anticancerígenas que presenta estas especies tal como: *Ophiocordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *C. sphecocephala*, *C. oxycephala*, *C. elongot Stromata* y *C. japonensis* (Nam, et al., 2006: p. 57-61).

Estudios anteriores presentados como en el artículo de revisión “*The genus Cordyceps: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*” presentado por Poeyemi Joshue Olatunji y colaboradores en el 2018, justifican una información previa de la determinación de la composición química, farmacológica y diferentes usos tradicionales de hongos entomopatógenos con riqueza química, genética y terapéutica.

El estudio sobre el género “*Cordyceps*”, caracterizado por una recopilación de información taxonómica, encontró compuestos de interés químico, biológico y farmacológico, del total de 750 especies de *Cordyceps* identificadas, el estudio permitió establecer que tan solo 35 especies han tenido uso terapéutico y tradicional, cabe mencionar que las especies *C. sinensis* y *C. militaris* representan solo el 60% de los datos disponibles y obtenidos en este estudio, siendo los compuestos activos determinados en este género *Cordyceps*; nucleósidos, esteroides-flavonoides, péptidos cíclicos, fenólicos, bioxantracenos, policétidos y alcaloides (Olatunji, OJ et al, 2018: p. 293-316).

La cordicepina fue un nucleósido encontrado en el género *Cordyceps*, el cual presenta su mayor abundancia con un amplio espectro de actividad terapéutica, también se determinó la presencia de otros compuestos químicos; adenina, adenosina, uracilo, uridina, guanidina, guanosina, hipoxantina, inosina, timina, timidina y desoxiuridina. Las propiedades atribuidas a este grupo de compuestos con actividades farmacológicas son; propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales, inmunomoduladores, antiarrítmico, antitumorales, citotóxica, hipoglucemiante, antimicrobiano y antioxidante (Olatunji, OJ et al, 2018: p. 293-316).

Adicionalmente los estudios de actividad biológica, se consideran factores como el grado de toxicidad y seguridad en el uso de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps*, se establecieron valores de seguridad de hasta 80 g/Kg (modelo en ratones) por un tiempo de

exposición de 3 meses, según estos modelos no se evidenció alteración en la funcionalidad de órganos como el hígado, sangre y riñón, sin embargo se presentaron efectos indeseables a nivel gastrointestinal como; náuseas, diarrea y xerostomía (Olatunji, OJ et al, 2018: p. 293-316).

Por otro lado, en el “Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates.”, se establecen formulaciones a considerar para la producción del componente bioactivo cordicepina, un nucleósido de *Cordyceps militaris*, aspecto que aportó a la metodología del presente estudio. (Mohd, A et al, 2017: p. 617 -621).

En este sentido, para promover el crecimiento del hongo in vitro, se aplicó la siguiente formulación considerando a un volumen de 100 mL contiene; agua destilada, glucosa 1.5%, peptona 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%,  $\text{NaCl}$  0.05%, temperatura óptima 25°, incubación durante 21 días, pH 5.0 – 6.0. Para una fermentación en estado sólido; 20 gramos arroz o trigo o avena como sustrato sólido, 30 mL del medio basal, autoclave 30 min, 121°C, inoculación de 5mL del inóculo, incubación durante 12 días aislado de la luz para promover el crecimiento vegetativo con base en esta fórmula (Mohd, A et al, 2017: p. 617 -621).

El tiempo requerido para la formación de cuerpos fructíferos es posterior a los 12 días, la temperatura a mantener es de 16°C en la noche a oscuridad, 23°C durante el día y 80 – 95% de humedad relativa. Para la extracción de la biomasa fúngica las muestras se mezclan en metanol para la extracción, se requiere un equipo sonicador en un intervalo de tiempo de 10 min, centrifugación 20 min a 2795 rpm, recoger el sobrenadante y filtrar en membrana 0.2  $\mu\text{m}$ , análisis por HPLC frente a estándares de cordicepina a una longitud de onda 260 nm (Mohd, A et al, 2017: p. 617 -621).

Mediante esta metodología de cultivo se logra producir una cantidad de 565.20, 638.85 y 814.60 mg/gramo respectivamente de cordicepina, los factores considerados permiten un mayor rendimiento según la variación de estos, pero se requiere más investigación para lograr una metodología fiable y una posible automatización del proceso (Mohd, A et al, 2017: p. 617 -621).

## **1.2. Bases teóricas**

### **1.2.1. Micología**

Palabra de estructura etimológica (del griego *mykes*: hongo; *logos*: estudio) se define, como la ciencia que estudia los hongos; también denominado micetología. Esta ciencia constituye una

rama de la biología aplicada al estudio del reino Fungi y su rol fundamental entre los demás reinos conocidos con los cuales mantiene múltiples relaciones otorgando un balance dinámico en los ecosistemas (Pedraza, H, 2013: p. 13).

### **1.2.2. Los hongos y la medicina tradicional**

#### ***Hongos***

Los hongos son organismos pertenecientes al reino *Fungi*, presentan un núcleo definido y poseen una alta complejidad con características similares a los animales y a las plantas, su nombre deriva del latín *fungus*: planta talófila, carente de clorofila, presentan tamaños variados y su reproducción es asexual y sexual por medio de la producción de esporas; viven sobre materiales orgánicos en descomposición o generan un mecanismo de parasitación en otras especies en la naturaleza, presentan estructuras filamentosas y ramificadas denominado micelio (Pedraza, H, 2013: p. 13).

#### ***Medicina tradicional***

Los hongos han llamado la atención desde tiempos remotos en diferentes civilizaciones por las propiedades neurotrópicas o alucinógenas, su acción biológica sobre el sistema nervioso central no proporciona adicciones, se evidencian alucinaciones e ilusiones al estar expuestos, su uso tradicional entre diversos grupos étnicos está presente en Papúa Nueva Guinea, noreste de Siberia, Canadá, Estados Unidos y principalmente México (Guzmán, G, 2011: p. 1-7).

### **1.2.3. Especies de Hongos estudiados**

Los hongos son fuente de alimento y materia prima para la industria farmacéutica, por la característica de poseer una mayor masa biótica como un ser individual, sus usos también están destinados para mantener y mejorar la salud, conservar la juventud e incrementar la longevidad, los hongos han despertado el interés en países asiáticos y su tradición sobre el consumo de hongos (setas) como *Cordyceps sinensis* (Figura 2-1), uno de los hongos medicinales de mayor relevancia en el mundo, originario de los territorios tibetanos (Li, S. et al, 2006: p. 1571).

*Cordyceps sinensis* pertenece al grupo de los hongos entomopatógenos. Otros hongos de similar relevancia por sus características medicinales son: Reishi o ling zhi, (*Ganoderma lucidum*); maitake (*Grifola frondosa*); meshima (*Phellinus linteus*); zhuling (*Polyporus umbellatus*), yuzhi

(*Trametes versicolor*). Existe referencia de más de un millón de especies de hongos en el planeta, sólo unas 70000 han sido descritas (Li, S. et al, 2006: p. 1571).

#### **1.2.4. Género *Cordyceps***

##### **Ácido cordicéptico**

El ácido cordicéptico es un isómero del ácido quínico, es uno de los principales componentes químicos activos de *Cordyceps sinensis* identificado en 1957 por Sprecher y Sprinson (Sprecher M, Sprinson DB, 1963: p. 2490-2491).

##### **Polisacáridos**

Los polisacáridos se pueden obtener a partir de diferentes especies de hongos, son polímeros de glucosa (glucanos), en la cadena principal presentan uniones beta 1-3 y en las ramificaciones dispuestas glucosas en posición 1-6. Presentan la característica de inhibir el desarrollo de metástasis postquirúrgicas posterior a una extracción de tumor (Kuklinski, C, 1999: p. 381).

##### **Polisacáridos de *Cordyceps***

Los polisacáridos son los principales compuestos bioactivos principales del género *Cordyceps*, representan en cantidad un aproximado del 3 – 8 % del peso total, se los puede encontrar en los cuerpos fructíferos, en el micelio producto del crecimiento en un medio fermentado sólido, estas macromoléculas biológicas poseen propiedades fisicoquímicas consideradas de amplio espectro y actividad farmacológica como antitumoral e inmunomodulador (Zhou, X et al, 2009: p. 279-291).

##### **Relación patógeno-hospedero en hongos**

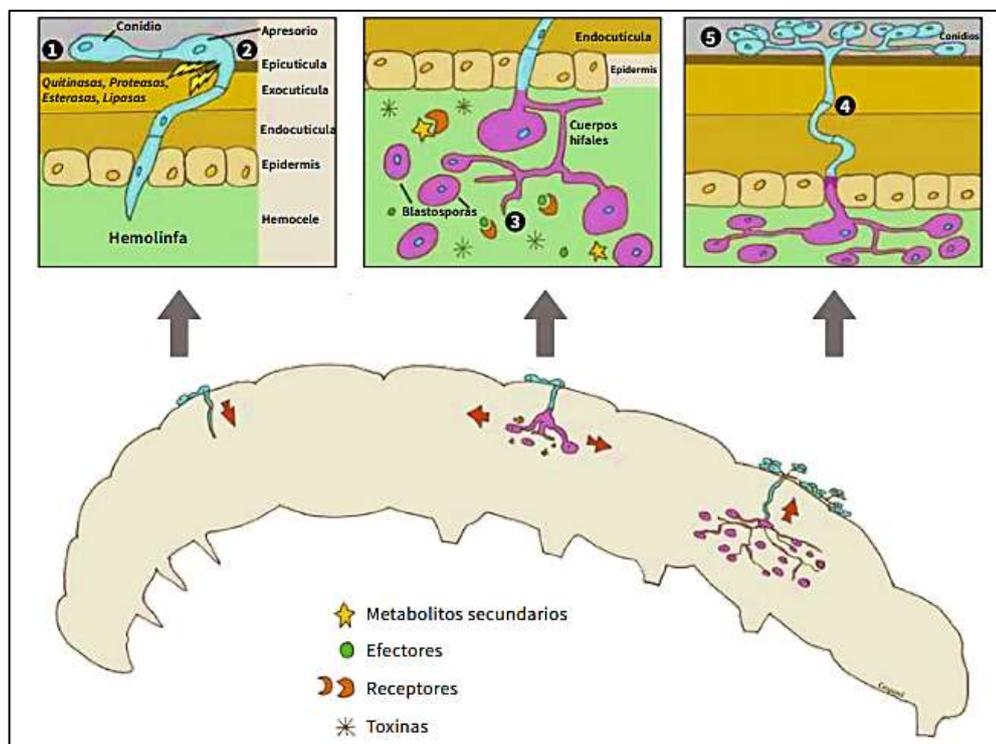
Los hongos entomopatógenos son agentes reguladores poblacionales de insectos, estos dependen de la susceptibilidad del hospedero para favorecer a la expresión de genotipos del patógeno; sin embargo, para que el hongo prospere intervienen también factores bióticos y abióticos, destacándose que los nutrientes del insecto son el medio fundamental para la propagación, dispersión y sobrevivencia de la especie (Pucheta, M et al, 2006).

##### **Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos**

Una estructura característica de los hongos (Figura 1-1), los conidios se adhieren a la cutícula del insecto, germinan formando el apresorio, degradan la cutícula es fundamental la interacción

enzimática generada por la presión osmótica en presencia de las altas concentraciones de glicerol, derivado de la hidrólisis de los lípidos que contienen los conidios germinados, dentro del insecto en el hemocele las hifas introducidas producen blastosporas para infectar y colonizar al hospedero, de tal manera pueden aprovechar los nutrientes (Espinel. C et al, 2018: p. 340-342).

El hospedero (insecto) genera una respuesta inmune frente a las blastosporas, pero son evadidos por metabolitos secundarios y proteínas efectoras secretadas como respuesta frente a los receptores del hospedero lo que lleva consigo a la muerte del insecto, el hongo entomopatógeno logra colonizar por completo y las nuevas hifas emergen del insecto formando las células conidiógenas. Si las condiciones ambientales son óptimas favorecerá a la esporulación y diseminación del hongo y posteriores infecciones a nuevos hospedadores (Espinel. C et al, 2018: p. 340-342).



**Figura 1-1:** Esquema del proceso de infección de un hongo entomopatógeno

Fuente: (Espinel, C et al, 2018: p. 343).

### 1.2.5. *Cordyceps*

*Cordyceps* es un género de hongos de los conocidos como entomopatógenos, del filo Ascomycota, estos parasitan insectos en todo su ciclo de vida (Figura 3-1), presentan una característica de usar los recursos de los insectos como sustrato para su desarrollo y necesidades vitales, pueden atravesar el exoesqueleto de sus hospederos, interacción realizada al hidrolizar la

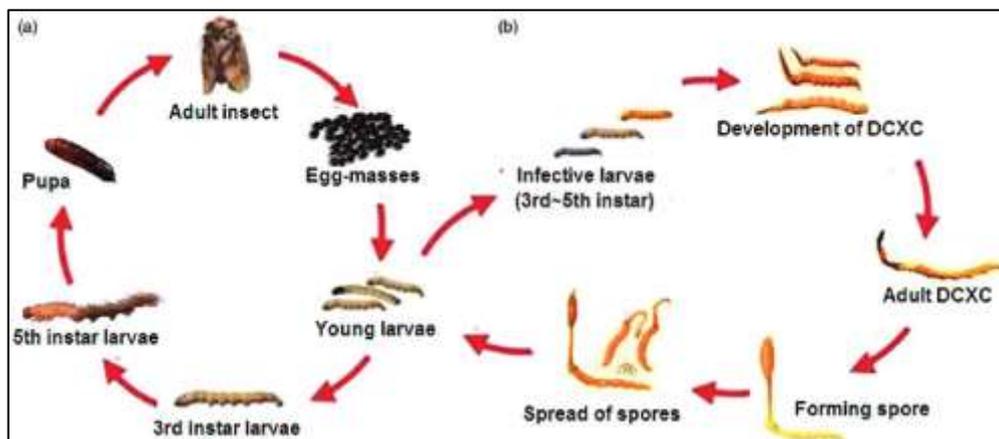
quitina hasta llegar al interior del hospedero donde ocurre la colonización y reproducción del hongo (Rojas, J et al, 2016: p. 18-20).

La Figura 2-1 y Figura 4-1 representan las especies del género de *Cordyceps* más estudiadas y representativas de estos hongos entomopatógenos *Cordyceps sinensis* y *Cordyceps militaris*.



**Figura 2-1:** *Cordyceps sinensis* Habitat natural

Fuente: (Chakraborty, Sudipta. et al, 2014: p.340).



**Figura 3-1:** *Cordyceps sinensis* Ciclo de vida

Fuente: (Chakraborty, Sudipta. et al, 2014: p. 340).



**Figura 4-1:** *Cordyceps militaris*

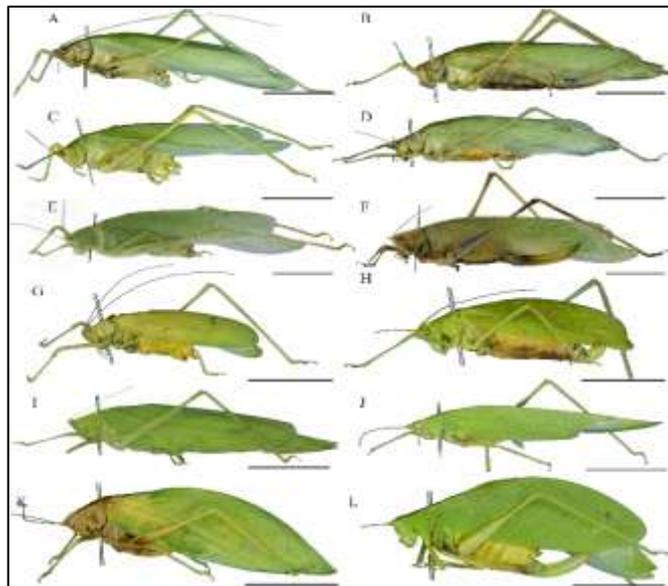
Fuente: (Terrestrial Fungi, 2022: p. 1).

### 1.2.6. Hospedadores

Un hospedador es un organismo con la capacidad de sustentar el desarrollo de un huésped o un simbiote (Ejemplo: parásito) (Clínica Universidad de Navarra. Diccionario médico, 2021: p. 1).

### **Tettigonidae**

Tettigonidae son insectos del orden de los ortópteros, conocidos como insectos hoja, Figura 5-1, se diferencian por sus particulares formas y colores caprichosos, alrededor del mundo se establecen unas 6400 especies aproximadamente, su habitat se encuentra distribuido entre zonas tropicales, subtropicales y templadas. Mantienen un sistema de protección ya que permanecen ocultos y quietos frente a sus depredadores durante el día y su mayor actividad es por la noche. La mayoría de estos insectos son herbívoros polífagos (Carvajal. V, 2020: p. 1).



**Figura 5-1:** Saltamontes Orthoptera: Tettigoniidae

Fuente: (Fianco, Marcos. et al, 2022: p.38).

### 1.2.7. Técnicas de extracción de drogas

#### *Maceración*

Esta técnica consiste en colocar en contacto la droga seca y triturada junto con el disolvente utilizado para la extracción a temperatura ambiente con agitación continua durante un tiempo según la característica de la droga. Esta técnica es usada cuando los principios activos son muy solubles y su estructura es permeable al disolvente.

## ***Digestión***

Técnica que consiste en un método extractivo similar a la maceración con la adición de temperaturas de trabajo más elevadas.

### **1.2.8. Tipos de Extractos**

#### ***Extractos fluidos***

Los extractos fluidos son de característica líquida, se utilizan como disolvente de la solución el alcohol. Su proceso de obtención se realiza por agotamiento de la droga en 2 lixiviaciones sucesivas, y concentrando la segunda fracción con la primera fracción, de modo que el peso del producto final corresponda exactamente al peso de droga seca de partida (Bruneton, J, 2001: p. 54-77).

#### ***Extractos secos***

De característica sólida, pueden ser polvos o granulados, en mezcla su contenido de agua debe permanecer entre 5-8%. Su consistencia es seca y pulverizable. Su alta hidroscopticidad puede dificultar su conservación (Bruneton, J, 2001: p. 54-77).

### **1.2.9. Estudio Farmacognóstico**

#### **Tamizaje Fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés, se fundamenta en pruebas preliminares sencillas y rápidas que permiten detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos (Miranda & Cuéllar, 2001: p. 159-161).

#### **Identificación de Compuestos Químicos- Metabolitos Secundarios**

El tamizaje fitoquímico se realiza sobre la materia prima; previamente secada y pulverizada. La droga cruda se puede extraer con los solventes: éter etílico, etanol y agua mediante un sistema de extracción sucesiva de solventes de polaridad creciente (menor a mayor polaridad); sobre la misma droga cruda (Miranda & Cuéllar, 2001: p. 159-161).

### **1.2.10. Métodos cromatográficos**

Los métodos cromatográficos se encuentran clasificados por sus mecanismos de separación, los que se encuentran entre diferentes medios; gas/sólido – líquido/sólido (cromatografía de absorción), gas/líquido – líquido/líquido (cromatografía por reparto), gas/sólido – líquido/sólido (cromatografía por exclusión), cromatografía por afinidad y cromatografía por intercambio iónico (Corzo, et al, 2019: p. 35-48).

#### **Cromatografía en columna**

La cromatografía en columna es un método analítico de separación por permeación en gel o de exclusión, permite separar compuestos presentes en una muestra mediante el recorrido de una fase móvil sobre la fase estacionaria, la fase estacionaria contiene disueltos los componentes de la muestra afines a su polaridad, la fase estacionaria o columna propiamente dicha puede comprender diferentes tamaños de poros con la finalidad de retener las moléculas por su forma y tamaño. La afinidad y velocidad de elución de los compuestos en una muestra permitirán la separación de las moléculas presentes. (Corzo, et al, 2019: p.35-48).

#### **Cromatografía capa fina**

Método mediante el cual se permite separar componentes de una muestra gracias a la migración diferencial de los componentes de la muestra a través de una capa fina de un material adsorbente sobre una placa inerte, permite determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras, seguimientos cinéticos en una reacción, entre otras aplicaciones. Presenta dos fases, una móvil y una estacionaria, la fase móvil recorre la superficie de la fase estacionaria llevando en su recorrido compuestos afines a su polaridad, la fase estacionaria retiene compuestos afines permitiendo la separación de los compuestos a analizar mediante esta metodología analítica. Esta técnica es muy favorable por sus características de gran reproductibilidad, bajo costo, versatilidad, fácil ejecución y separación en intervalos cortos de tiempo (Corzo, et al, 2019: p. 35-48).

### **1.2.11. Espectrofotometría Infrarroja (IR)**

La espectrofotometría infrarroja es un método analítico de medición, mediante la absorción de la radiación en un intervalo de longitudes de onda ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), permite identificar de manera cualitativa las estructuras funcionales presentes en una muestra, los espectros generados con esta técnica se encuentran representados por la intensidad relativa de cada compuesto a una

longitud de onda para cada una, esto permite su identificación usando espectros de referencia o registros de la sustancia a analizar (Rubinson, K, et al, 2000: p. 446 – 458).

### **1.2.12. Microorganismos de Ensayo**

#### ***Staphylococcus aureus***

El género *Staphylococcus* está formado por bacterias con forma esférica, Gram positivos, presentan diámetros de alrededor de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , se encuentran como microorganismos separados, en pares, tétradas o formando racimos de uvas. Su representante de mayor relevancia es *Staphylococcus aureus*, se aíslan con frecuencia en muestras clínicas con pacientes con infecciones, principal causante de bacteriemia nosocomial, crecen bien en medios de cultivo no selectivos como agar sangre, agar cerebro corazón, presentan resistencia farmacológica por lo que requieren una terapia prolongada o el uso de fármacos que incluyan rifampicina (Estrella, et al, 2014: p. 28-40).

#### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no forma esporas, presenta flagelos móviles, diámetro aproximado de 0,5  $\mu\text{m}$ , forma parte y predomina en la microbiota intestinal humana, en presencia de alteraciones fisiológicas esta puede encontrarse ocasionando enfermedades entéricas y diarreas, las cepas patogénicas representa uno de los problemas de salud pública en países en vías de desarrollo, se pueden identificar por sus características bioquímicas como catalasa positiva, oxidasa negativa, reducción de nitratos a nitritos (Canata, M. et al, 2015: p.13-17).

### **1.2.13. Método de difusión en disco en medio sólido**

Método para determinar la actividad antimicrobiana basado en la difusión radial de una solución sea un extracto o un antibiótico mediante la aplicación externa sobre una placa de agar previamente inoculada con microorganismos específicos. La difusión del extracto o antibiótico puede realizarse mediante sensidiscos, papel filtro o pozos excavados en la superficie del medio de cultivo inoculado. Los resultados se expresan con la formación de halos de inhibición con aclaramientos de la superficie del medio de cultivo de forma circular, se estima una mayor o menor actividad inhibitoria según el diámetro del halo de inhibición y la concentración del compuesto bioactivo aplicado durante el análisis.

#### 1.2.14. Antibióticos

##### *Cloranfenicol*

Cloranfenicol es un fármaco del grupo de los anfenicoles usado como antibiótico bacteriostático, interviene en la síntesis proteica bacteriana, presenta un amplio espectro frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, es usado en el tratamiento de infecciones derivadas por microorganismos resistentes a antibióticos comúnmente usados en la terapéutica (Calvo y Martínez, et al, 2008: p. 50).

Límites de los diámetros de las zonas de inhibición para cepas patrón.

Referencia para cloranfenicol 30 µg/mL *E. coli* ATCC 25922: **R** (Resistente  $\leq 12$ ), **I** (Intermedia 13-17), **S** (Sensible  $\geq 18$ ).

Referencia para cloranfenicol 30 µg/mL *S. aureus* ATCC 25923: **R** (Resistente  $\leq 12$ ), **I** (Intermedia 13-17), **S** (Sensible  $\geq 18$ ). (Picazo. J, 2000: p. 12-15).

## CAPÍTULO II

### 2. METODOLOGÍA

#### 2.1. Lugar de desarrollo de la investigación

El aislamiento y cultivo de la especie fúngica del género *Cordyceps* se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética del Centro de Investigación de la ESPOCH. La extracción de los compuestos químicos de interés se desarrolló en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias. La identificación de metabolitos secundarios se realizó en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica. La evaluación de la actividad antimicrobiana se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular y Genética del Centro de Investigación. Los análisis fisicoquímicos se realizaron en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias.

#### 2.2. Tipo y diseño de investigación

##### **Experimental:**

Diseño de tipo experimental, basado en realizar un análisis microbiológico del extracto de *Cordyceps* para determinar la actividad antimicrobiana que puede ejercer frente a cepas bacterianas, donde se seleccionaron: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El estudio se lo realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Genética del Centro de Investigación de la ESPOCH.

##### **Prospectivo:**

El estudio permite obtener resultados cercanos a la realidad de nuestro país, lo que pondrá a disposición una fuente alternativa de compuestos químicos de interés para uso terapéutico.

#### 2.3. Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo de la muestra

La población de estudio es el hongo entomopatógeno del género *Cordyceps*.

La muestra del hongo entomopatógeno a ser estudiado procede del Parque Etno-Botánico OMAERE ubicado en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza (Ecuador.1°28'26.0"S 77°59'43.8"W). La muestra de estudio se identificó por su taxonomía dependiendo del hospedador encontrado (insecto), se tomó solo una cantidad de *Cordyceps* (micelio-cuerpo

fructífero) que presentó esporas viables para ser aislado en un medio de cultivo selectivo para hongos, este procedimiento de recolección no modificó la estructura ecológica del ecosistema de OMAERE y su preservación del medio ambiente se mantuvo invariable.

Para la extracción de la muestra de estudio, se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

**Criterios de inclusión:**

La extracción de micelio del hongo entomopatógeno del género *Cordyceps* presente en un hospedador fácil de ser identificado taxonómicamente.

**Criterios de exclusión**

Hongo entomopatógeno que presente un daño por acción de depredadores, se encuentre en deterioro por acción del agua, humedad o viento.

**2.4. Hipótesis**

**Hipótesis general**

El extracto de *Cordyceps* contiene metabolitos secundarios de interés para la industria farmacéutica y presenta una actividad antimicrobiana.

**Hipótesis nula**

- El extracto de *Cordyceps* no contiene metabolitos secundarios de interés para la industria farmacéutica y no presenta una actividad antimicrobiana.

**Hipótesis alternativa**

- El extracto de *Cordyceps* contiene metabolitos secundarios de interés para la industria farmacéutica y presenta una actividad antimicrobiana.

**2.5. Identificación de las variables**

**Variable dependiente:** Actividad antimicrobiana (mm de halo de inhibición).

**Variable independiente:** Tres concentraciones del extracto de *Cordyceps* y 2 cepas bacterianas ATCC

## 2.6. Metodología

### 2.6.1. Toma de muestras del material biológico

Como material biológico se empleó micelio-cuerpos fructífero de *Cordyceps*. La Tabla 1-2 muestra el lugar de recolección.

**Tabla 1-2:** Lugar de procedencia de *Cordyceps*.

<b>Provincia</b>	Pastaza
<b>Cantón</b>	Puyo
<b>Parroquia</b>	Puyo
<b>Lugar</b>	Parque Etno-Botánico OMAERE

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

- Se realizaron visitas al Parque Etno-Botánico OMAERE ubicado en la provincia de Pastaza, en el cantón Puyo, dentro del paseo turístico del barrio Obrero (Ecuador. 1°28'26.0"S 77°59'43.8"W).
- Se procedió a una búsqueda exhaustiva visual de campo dentro del parque Etno-Botánico hasta encontrar un espécimen fúngico de características de ser un hongo entomopatógeno (*Cordyceps*) para aquello se identificó la presencia de insectos en el sector, observación de árboles y vegetación, monitoreo del suelo.
- Se identificó la presencia de insectos inmóviles sobre superficies de mediana y alta altura.
- Se observó al insecto, sus características de infección fúngica y la presencia de estructuras fúngicas sobre la superficie del insecto encontrado.
- Se tomaron solo las estructuras sobresalientes del hongo *Cordyceps* en la superficie del insecto con ayuda de unas pinzas estériles evitando la alteración ecológica de la ubicación de la especie fúngica.
- Se guardaron los micelios recolectados en tubos Eppendorf 1,5 mL estériles.
- Las muestras se guardaron hasta sus respectivos análisis.

### **2.6.2. Comprobación e Investigación taxonómica**

La identificación taxonómica se lo desarrollará mediante las características morfológicas del huésped y de la especie fúngica encontrada en correlación con información bibliográfica disponible.

### **2.6.3. Estudio morfológico**

Se utilizó el microscopio óptico disponible en el laboratorio de Biología Molecular y Genética del Centro de Investigación de la ESPOCH como herramienta visual para observar las estructuras microscópicas presentes en las muestras encontradas, también se hizo uso de las fotografías obtenidas del espécimen a estudiar para su caracterización.

### **2.6.4. Aislamiento y cultivo de *Cordyceps***

#### ***Aislamiento de Cordyceps***

Para aislar *Cordyceps* se prepararon las muestras previamente extraídas del insecto infectado, las estructuras recolectadas fueron los micelios (cuerpos fructíferos) de *Cordyceps*. Se preparó 1 mL agua destilada estéril y 0,1% (v/v) de Tween 80 en relación 8:2, se colocó en un tubo de ensayo estéril junto con las muestras iniciales. Esta mezcla se procedió a centrifugar por un tiempo de 10 min a una velocidad de 4000 rpm para la liberación de los conidios-esporas presentes en los peritecios del hongo entomopatógeno. Posterior a la centrifugación se extrajo el sobrenadante de la solución, se verificó mediante el microscopio la presencia de conidios-esporas, se inoculó en un caldo base esterilizado a 121 °C, 30 min para el crecimiento del hongo *Cordyceps* (Mohd. A et al, 2017: p. 618).

El medio base enriquecido descrito por Mohd Adnan, se aprecia en la Tabla 2-2

**Tabla 2-2:** Composición del medio base para crecimiento de *Cordyceps*

<b>Reactivos</b>	<b>Porcentaje</b>
Agua destilada	
Glucosa	1.5%,
Peptona	0.5%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%
MgSO <sub>4</sub>	0.05%
NaCl	0.05%
Valores para 100 mL de medio base. pH solución 5 -6. (Mohd. A et al.2017. 618 pp.)	

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

Se guardó el medio del caldo base inoculado en la estufa a una temperatura de 25 °C y se dejó crecer por un tiempo de 4 -5 días, para posterior su paso a medio sólidos.

### ***Cultivo de Cordyceps***

Durante el tiempo de incubación de las muestras, germinaron los conidios en el medio líquido, para constatar el crecimiento se observaron las estructuras formadas mediante el uso del microscopio óptico.

Para cultivar *Cordyceps* se preparó un inóculo ajustado con una concentración de 10<sup>5</sup> conidios/mL (conteo en cámara de Neubauer) en una solución agua destilada/Tween 80 anteriormente mencionado. Se sembró en un medio sólido agar PDA exclusivo para el crecimiento de hongos por su expresión de mejor desarrollo en el crecimiento. También preparó agar PDA en agar inclinado utilizando el medio de cultivo deshidratado a un volumen de 100 mL y se los distribuyó en tubos de ensayo estériles, los cuales se procedieron a inclinar durante su distribución, se dejaron solidificar los tubos con el agar PDA. Una vez solidificado el medio de cultivo en pico de flauta se inocularon en el mismo inóculo preparado.

Los tubos con agar PDA en pico de flauta se incubaron a una temperatura de 25 °C durante 4 – 5 días, en los que se observó un crecimiento micelar de *Cordyceps*. Este crecimiento sirvió como inóculo para transferir el hongo al sustrato de arroz enriquecido con medio base selectivo. La cepa correcta de hongos a ser cultivada en medios sólidos procederá del crecimiento de *Cordyceps* en esta característica. Para pasar a un medio sólido se preparó el medio base enriquecido anteriormente descrito por Mohd Adnan (Mohd. A et al, 2017: p. 618).

Para garantizar el crecimiento de hongos es fundamental la existencia de una humedad elevada, alrededor de 90 – 95% y una temperatura de 25- 40 °C. El sólido requerido para la fermentación fue arroz integral en una proporción del 20 % p/v con el volumen del medio base, el medio sólido y el medio base deben pasar por un proceso de esterilización, para ello se usó el autoclave a una temperatura de 121 °C, 30 min y 1 atm de presión.

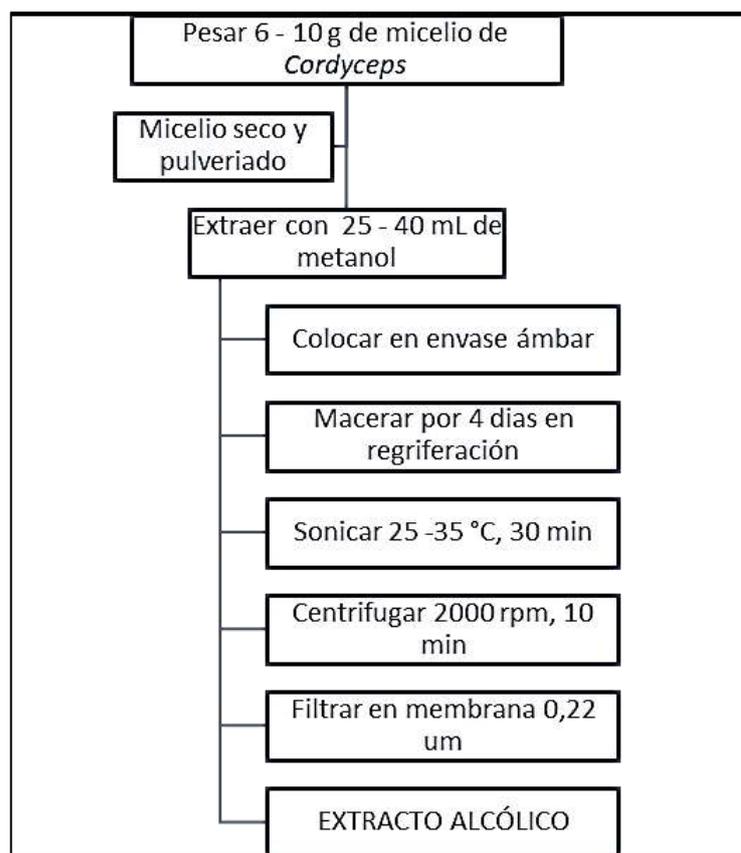
Se procedió a inocular un volumen de 5 mL de inóculo de *Cordyceps* en el medio sólido enriquecido previamente lavado y esterilizado, el cultivo se incubó en un periodo de 45 días, en condiciones de limitación de luz durante los 5-7 primeros días de incubación y exposición a luz en los posteriores días hasta el día 45 de crecimiento. Posterior a los 45 días de crecimiento, se observó el crecimiento del micelio, este se lo recuperó mediante la extracción del medio sólido remanente y su posterior lavado para eliminar algún excedente del medio base.

El micelio de *Cordyceps* recuperado se cortó para reducir su tamaño, los trozos fueron almacenados en tubos (Boeco-Germany) de 50 mL y refrigerados hasta su posterior uso. El micelio del hongo entomopatógeno se secó en una estufa de flujo de aire a una temperatura máxima de 70 °C para evitar la alteración de compuestos bioactivos de interés. El micelio seco se pulverizó mediante un mortero para reducir el tamaño de partícula y aumentar la eficiencia en la extracción.

#### **2.6.5. Estudio cualitativo de metabolitos secundarios**

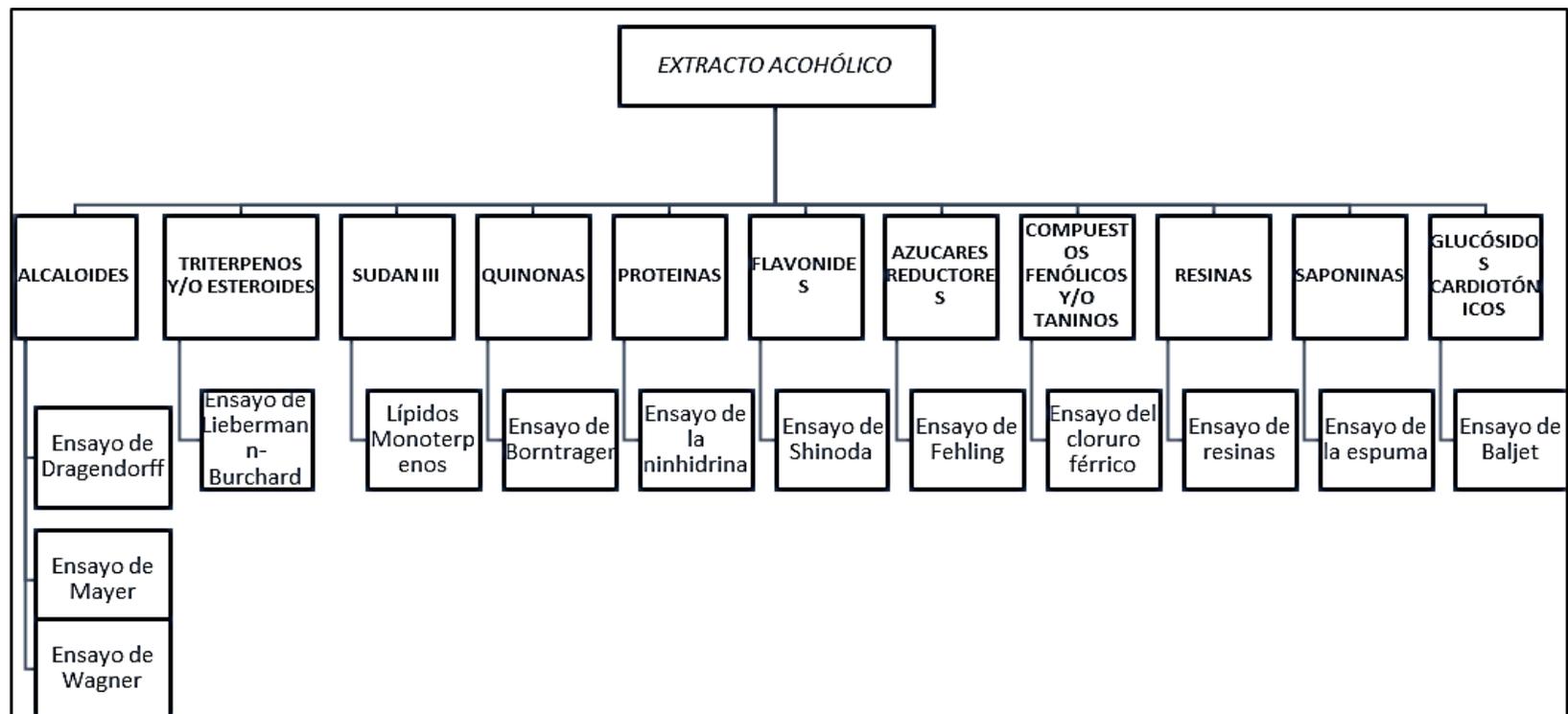
##### **Tamizaje fitoquímico**

Para determinar la presencia de metabolitos secundarios en el hongo *Cordyceps* se realizó un extracto en un solvente polar (Metanol) como lo muestra la Gráfica 1-2, posteriormente se ejecutaron pruebas cualitativas de reacción y coloración para la identificación de los principales grupos activos como se muestra en la Gráfica 2-2. El *screening* fitoquímico permite la fácil identificación de metabolitos y es bajo costo lo que permite que el análisis presente una buena factibilidad. Los metabolitos secundarios encontrados en la muestra de *Cordyceps* permitirán cumplir con los objetivos propuestos en esta investigación.



**Gráfica 1-2:** Preparación del extracto de *Cordyceps* para el análisis de metabolitos secundarios

**Elaborado por:** Quishpe, Josué, 2021.



**Gráfica 2-2:** Reacciones cualitativas para identificación de metabolitos secundarios

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

## **Ensayos:**

### ***Ensayo de Dragendorff***

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, se debe evaporar en baño de agua el exceso de disolvente orgánico y el residuo redisolver en 1 mL de HCl al 1% en agua. Si el extracto es acuoso a la alícuota se le añade 1 gota de HCl concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas de reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++) (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Mayer***

Permite reconocer la presencia de alcaloides, en la fracción ácida del extracto se le adiciona una pizca de NaCl en polvo, se agita y se filtra. Al filtrado se le adiciona 2 - 3 gotas de solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++) (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Wagner***

Ensayo para el reconocimiento de alcaloides, se parte de una solución ácida, añadiendo 2 - 3 gotas del reactivo de Wagner, se reporta los resultados de igual forma que en el ensayo anterior (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Lieberman – Buchard***

Permite reconocer la presencia de terpenos y/o esteroides, compuestos que poseen un núcleo de androstano. Se debe realizar en una fracción con cloroformo, si el extracto no se encuentra en cloroformo, se debe evaporar el disolvente y redisolver en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se agita, por la pared del tubo de ensayo se añaden 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitación. El ensayo será positivo si presenta un cambio rápido de coloración, rosado-azul (muy rápido), verde intenso-visible (rápido), verde oscuro-negro (final de la reacción) (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Bornträger***

Ensayo que permite reconocer la presencia de quinonas, para aquello, la fracción debe encontrarse en cloroformo, de no estarlo, se debe evaporar el solvente y redissolver en 1 mL de cloroformo, se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5%, se requiere agitación y reposo. El ensayo será positivo si la fase superior acuosa se colorea de rosado, (++) o rojo (+++). (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de la ninhidrina***

Ensayo que determina los grupos libres o aminoácidos, Se requiere una alícuota de extracto alcohólico, se adiciona 2 mL de una solución acuosa de ninhidrina al 2 %, se mantiene la mezcla en reposo por un tiempo estimado de 5-10 minutos en baño María. La presencia de estos grupos funcionales será positivo cuando se presenta una coloración azul-violácea (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Shinoda***

Permite reconocer la presencia de flavonoides. Para una muestra del extracto en disolvente alcohólico, se realiza una dilución de la fracción con 1 mL de HCl concentrado y una pequeña porción de cinta de magnesio metálico. Se espera 5 minutos después de la reacción, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases mediante agitación y se espera hasta que se separen. Los resultados se consideran positivos cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Fehling***

Ensayo que determina la presencia de azúcares reductores. Si el extracto no es acuoso, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redissolver en 1-2 mL de agua. En la fracción acuosa se adiciona 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua durante 5-10 minutos. La coloración rojo o presencia de un precipitado rojo se considera como ensayo positivo (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Cloruro Férrico***

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. A una fracción del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de FeCl<sub>3</sub> al 5% en solución de cloruro de

sodio al 0.9% en agua. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. Positivo para coloraciones rojo o vino en presencia de compuestos fenólicos en general, coloración azul para taninos y una coloración verde intensa para taninos pirocatecólicos (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Resinas***

Ensayo para detectar este tipo de compuestos, se adiciona a 2 mL del extracto alcohólico, 10 mL de agua destilada. La formación de un precipitado en la mezcla indica un ensayo positivo (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Espuma***

Ensayo que determina la presencia de saponinas (esteroidal como triterpénica). Si el extracto es alcohólico, se diluye con 5 veces el volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. La formación de espuma en la superficie superior de más de 2 mm de altura y su permanencia durante más de 2 minutos será considerado como ensayo (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

### ***Ensayo de Baljet***

Permite identificar la presencia de compuestos lactónicos como cumarinas, para aquello, se debe evaporar el disolvente diferente de alcohol y redissolver en la menor cantidad de alcohol (~1 mL), se adiciona 1 mL de reactivo, se considera el ensayo positivo a la aparición de coloración o precipitado de color rojo (++ y +++) respectivamente (Sisalema, D, 2013: p.10-15).

## **2.6.6. Elaboración del extracto alcohólico de *Cordyceps***

Se pesaron entre 6 -10 gramos de micelio de *Cordyceps* seco y pulverizado, se colocó a colocar en un recipiente de vidrio de color ámbar con un volumen de 25 - 40 mL de metanol, se mantuvo un tiempo de maceración durante 96 horas en refrigeración a una temperatura de 5 – 8 °C, después fue llevado al sonicador por un tiempo de 30 min a una temperatura de entre los 25 – 35 °C, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, luego se procedió a filtrar en un filtro de 0,22 µm, se mantuvo en refrigeración hasta realizar los análisis pertinentes (Oh, J. et al, 2018).

### **2.6.7. Separación cromatográfica**

Se empleó una columna de 1,1 cm de diámetro por 25 cm de largo, empacada con sílica gel (60 GF<sub>254</sub>, MERCK). El extracto metanólico de *Cordyceps* se sembró en la columna y se recorrió con un volumen de 200 mL de n-hexano. En el proceso de separación cromatográfica se obtuvieron 25 fracciones entre 5 – 6 mL, para determinar la presencia de compuestos químicos en las fracciones recolectadas se verificó con cromatografía en capa fina, para ello se utilizó una fase móvil correspondiente a una mezcla de solventes; n-hexano, EtOAc (1:1).

### **2.6.8. Control del extracto**

#### **Requisitos Organolépticos**

- **Olor**

Para su determinación se utilizó una tira de papel filtro y se colocó unas gotas del extracto de *Cordyceps*, se procede a oler y se reporta el resultado.

- **Color**

Se determina mediante la observación del color, presencia o ausencia de partículas en la solución

#### **Determinación de la densidad: Densidad relativa**

La densidad relativa es la relación entre la masa de un volumen de una solución o muestra y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura, la temperatura a considerar en esta determinación es a 25 °C. Una vez determinado la densidad relativa el resultado es equivalente al peso específico.

Se determina obteniendo el peso de un picnómetro vacío y seco, posterior medir el peso de la muestra a ensayar en el picnómetro ajustando el líquido al aparato de medición, se debe mantener la misma temperatura de 25 °C en todas las mediciones. Se repite la operación con agua destilada y se registran los resultados

Para el cálculo de la densidad relativa a 25°C se aplica la siguiente ecuación:

$$D_{25\text{ }^{\circ}\text{C}} = \text{Masa} / \text{Volumen}$$

## **Determinación de pH, método de medición en potenciómetro**

El pH es un indicador de la concentración de los iones hidrógenos determinando así la acidez o alcalinidad de las sustancias. Se calcula mediante la ecuación:  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$

Donde,  $[\text{H}^+]$  = actividad de los iones hidrógeno.

Para su determinación se requiere un equipo de medición de pH (Potenciómetro), antes de realizar la medición se requiere ajustar el equipo con una solución reguladora de pH de valor conocido en referencia al valor o rango que presente la muestra, una vez ajustado el equipo se procedió a medir la muestra introduciendo el electrodo sobre la muestra.

## **Determinación de Humedad y Cenizas**

### **Humedad**

El porcentaje de humedad se examinó mediante una termobalanza (RADWAG PMC 50) y lectura directa en el equipo. Adicionalmente se aplicó el método estándar por pérdida de peso a 110 °C de 2 – 4 horas.

### **Cenizas**

Las cenizas son residuos inorgánicos de los alimentos que permanecen en la muestra posterior a la ignición u oxidación completa de la materia orgánica presente en una muestra incinerada a 550 °C durante un periodo de 5 horas.

Para esta determinación se requiere obtener el peso constante de un crisol limpio y seco con su respectiva tapa que permanecerá por un tiempo de 15 minutos en la mufla a 550 °C para eliminar algún agente que altere la determinación de cenizas en una muestra, se hará uso de un desecador para enfriar de manera gradual el crisol para continuar con el registro del peso constante del crisol vacío. Luego se procederá a pesar de 1-2 gramos de la muestra a analizar, la muestra se preincinera frente a un mechero de Bunsen, posteriormente se coloca en la mufla precalentada a 550 °C por un tiempo de 2 horas, se retira y coloca en un desecador para mejorar el enfriamiento, para finalizar se debe registrar el valor del crisol con las cenizas hasta obtener un peso constante (Real Farmacopea Española, 2002: p. 2803)

Cálculo del porcentaje de cenizas totales:

$$C \text{ totales} = \frac{[ M2 - M ]}{[ M1 - M ]} \times 100$$

M = masa del crisol vacío, (g)

M1 = masa del crisol + muestra, (g)

M2 = masa del crisol + ceniza, (g) (Real Farmacopea Española, 2002: p. 2803)

### **Espectrofotometría infrarroja (IR)**

Para determinar de manera cualitativa los grupos funcionales presentes en el micelio seco y pulverizado de *Cordyceps* se utilizó el espectrofotómetro infrarrojo Jasco FT/IR-4100 para obtener el espectro que se precedió a su correspondiente interpretación.

### **2.6.9. Ensayo de Actividad Antimicrobiana**

#### **Método de Difusión en agar**

Se fundamenta en la formación de halos de inhibición sobre la superficie de un agar previamente inoculado con un microorganismo, esta inhibición se genera debido a la difusión de las sustancias activas de extracto o sustancia en estudio, los resultados se reportarán mediante la medición en mm del halo formado.

#### **Microorganismos de estudio**

Los microorganismos de estudio fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 del Laboratorio de Biología Molecular y Genética del Centro de Investigación de la ESPOCH.

#### **Preparación de muestras para el ensayo**

Se pesa 1000 mg del extracto crudo de micelio y se disuelve en 4 mL de metanol, se macera por 96 horas a 5 - 8 °C, se lleva al sonicador por 30 minutos a una temperatura de 25 – 35 °C, se filtra en una membrana de 0.22 µm. Una vez conseguido el extracto se puede evaporar el disolvente y restituir con 4 mL de DMSO, consiguiendo una concentración final de 250 mg/mL. Se realiza las diluciones correspondientes hasta llegar a las concentraciones de 2500 µg/mL, 1000 µg/mL y 500 µg/mL.

## **Preparación de los medios de cultivo**

Agar Müeller Hinton: Se disuelven 37 g de Agar Müeller Hinton en un litro de agua destilada, se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos a 1 atm de presión, después se deja enfriar hasta una temperatura de distribución de 45 - 50 °C, se reparte en las cajas Petri estériles (25 -30 mL de agar por caja) cantidad suficiente para aproximadamente 40 cajas (Britanialab s.a, p.1).

## **Reactivación de los microorganismos**

Las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 se reactivaron en caldo soya triptica y se incubaron a 37 °C por 18 – 24 horas, después se transfirieron 100 µL de suspensión bacteriana a 10 mL de solución salina. Cabe acotar que la preparación del inóculo para la siembra en agar requiere de una densidad de 0.5 en la escala McFarland, equivalente a  $1 \times 10^8$  bacterias por mL.

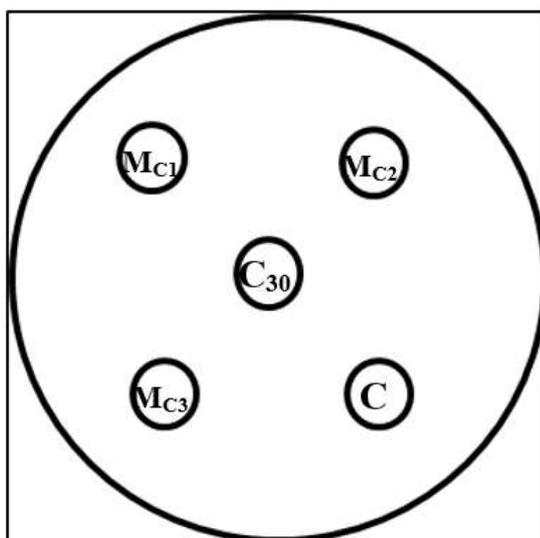
## **Siembra de microorganismos en medios sólidos**

Las placas de Agar Müeller Hinton no deben presentar contaminación al momento de ser inoculadas con los microorganismos a evaluar, una vez preparadas, se toma un hisopo estéril y se sumerge en la suspensión de cada microorganismo previamente homogenizado, se descarga un exceso de solución por las paredes del tubo de ensayo que los contiene y se procede a distribuir sobre la placa de agar solido hasta cubrir la totalidad de la superficie. Este proceso se realiza con cada microorganismo de estudio, en la cantidad de cajas requeridas por ensayo.

## **Colocación de Discos de inhibición y carga con los extractos de *Cordyceps***

Una vez inoculados los microorganismos en la placa de agar, se colocan de manera cuidadosa los discos de inhibición con ayuda de una pinza estéril como se muestra en la Figura 1-2.

Una vez colocados los sensidiscos en blanco sobre la placa de agar se carga con ayuda de una micropipeta los extractos de *Cordyceps* de concentración conocida a evaluar (2500 µg/ml, 1000 µg/ml y 500 µg/ml) en un volumen de 15 – 20 µL, también se evalúa el efecto del disolvente DMSO. Se colocan sensidiscos de referencia con el antibiótico conocido (Cloranfenicol 30mcg) a ser evaluado para su comparación mediante los resultados. Después de la colocación de los sensidiscos y las soluciones, las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.



**Figura 1-2:** Platilla utilizada para la colocación de sensidiscos.

**Referencia:** ( $M_{C1}$ ,  $M_{C2}$ ,  $M_{C3}$ ) = concentraciones del extracto de *Cordyceps*,  $C_{30}$  = Cloranfenicol 30mcg, **C** = control DMSO

**Elaborado por:** Quishpe, Josué, 2021.

## Lectura de resultados

Posterior a las 24 horas de incubación se retira de la estufa las placas y se procede a medir los diámetros de los halos de inhibición formados en cada microorganismo, se registra los datos se registraron para su posterior análisis.

## Interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad

SENSIBLE: (S) Inhibición del crecimiento de microorganismos

INTERMEDIO: (I) Inhibición intermedia del crecimiento de microorganismos

RESISTENTE: (R) Presencia de crecimiento de microorganismos

## 2.7. Materiales, equipos y reactivos

### Material biológico

- Hongo entomopatógeno del género *Cordyceps*
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922

### Materiales

- Probeta 100 mL

- Embudo simple
- Erlenmeyer 100 mL y 250 mL
- Probetas de vidrio 25 mL, 50 mL, 100 mL y 500 mL
- Pipetas de vidrio 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL
- Placas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo de vidrio
- Frascos de vidrio ámbar 5 mL, 10mL y 25 mL
- Viales de vidrio ámbar
- Espátula
- Asa de Digrafsky
- Asa microbiológica
- Cámara de Neubauer

### **Reactivos**

- Agua destilada
- Cloranfenicol
- Glucosa
- Peptona
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- $\text{MgSO}_4$
- NaCl
- Metanol
- Cloroformo
- Acetona
- Acetato de etilo
- n-hexano
- Tween 80
- Gel de sílice
- Reactivo Baljet
- Cloroformo
- Ácido sulfúrico concentrado
- Colorante Sudan III
- Solución de carbonato de sodio
- Ácido clorhídrico 1%
- Reactivo de Fehling A

- Reactivo de Fehling B
- Reactivo de Dragendorff
- Cloruro de Sodio
- Solución de tricloruro férrico al 5 %
- Reactiva de Mayer
- Reactivo Wagner
- Ácido clorhídrico concentrado
- Agua destilada
- Cinta de magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Reactivo para resinas
- Reactivo de Sudan
- Reactivo de  $\text{FeCl}_3$
- Reactivo de Lieberman Buchard
- Reactivo de Ninhidrina
- Reactivo de Borntrager
- Reactivo de Shinoda

### **Medios de cultivo**

- Agar Papa Dextrosa
- Agar Müeller Hinton
- Agar Macconkey
- Medio sólido de Arroz integral

### **Equipos**

- Balanza analítica
- Termobalanza
- Autoclave
- Estufa
- Incubadora
- Sorbona
- Cabina de flujo laminar
- Sonicador
- Potenciómetro
- Baño María

- Refrigerador
- Centrifuga
- Espectrofotómetro IR
- Lámpara UV 365nm

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1. Cultivo de *Cordyceps*

##### Taxonomía del hospedador, insecto del orden Orthoptera

La taxonomía de la especie del insecto infectado y colonizado se obtuvo bibliográficamente con las características presentadas por el insecto, la información se encuentra representada en la Tabla 1-3.

**Tabla 1-3:** Taxonomía del hospedador

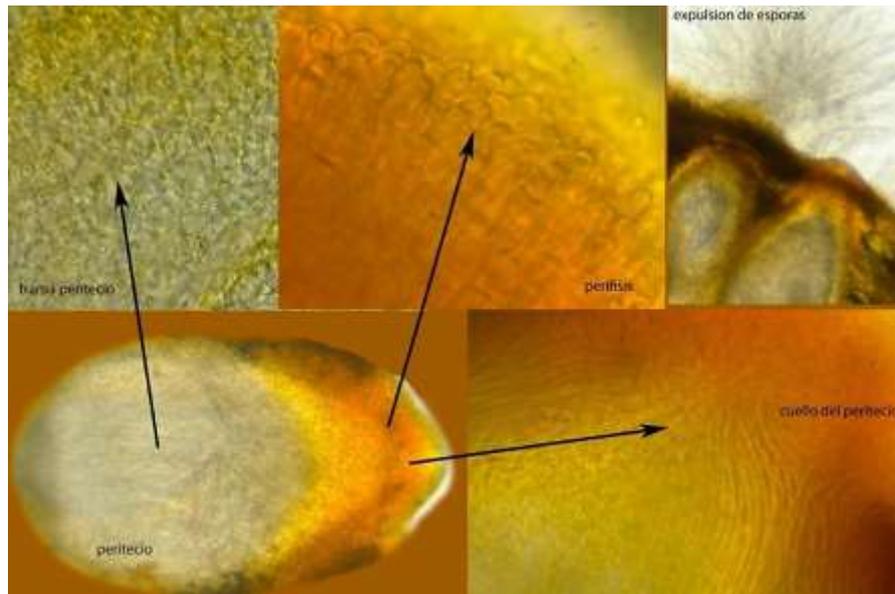
<b>Reino</b>	<i>Animalia</i>
<b>Filo</b>	<i>Arthropoda</i>
<b>Clase</b>	<i>Insecta</i>
<b>Orden</b>	<i>Orthoptera</i>
<b>Clasificación superior</b>	<i>Tettigonioidea</i>
<b>Nombre científico</b>	<i>Tettigoniidae</i> (Catalogue of Life Checklist, 2021)

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

##### Taxonomía de la especie fúngica del género *Cordyceps*

La taxonomía del hongo entomopatógeno del género *Cordyceps* estudiado, se logró mediante la observación microscópica de estructuras fúngicas pertenecientes a este género de hongos y su correlación bibliográfica de estudios realizados sobre diferentes especies de este género.

Los cuerpos fructíferos presentes en las muestras recolectadas presentaron una característica de cuerpo blando de coloración amarilla de 0,5 – 1 mm, de largo con forma elíptica- ovalada con forma de pico en la parte distal como lo muestra la Figura 2-3, los peritecios se ubican sobre los estromas sobresalientes del insecto *Tettigoniidae* vistos en la Figura 3-3, la parte central del peritecio está lleno de hifas y sobre la superficie de este se presentan ascosporas descritos en la Figura 4-3, estructuras semejantes a la de los hongos superiores del género *Cordyceps*, especie *C. militaris* descrito en la Figura 1-3.



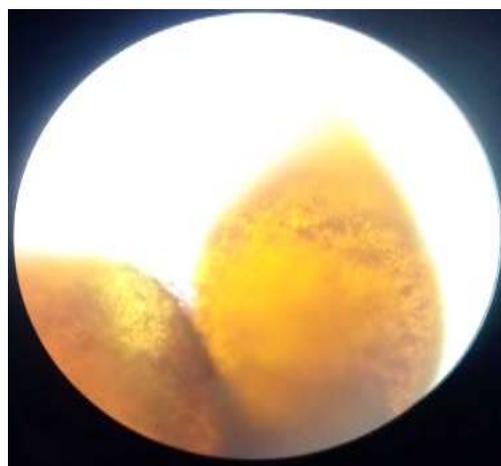
**Figura 1-3:** Microscopía de *Cordyceps militaris*

Fuente: (Ander J, 2019: p. 1)



**Figura 2-3:** Cuerpos fructíferos de especie fúngica en estudio

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.



**Figura 3-3:** Peritecio de especie fúngica

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.



**Figura 4-3:** Ascosporas en superficie

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

Los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* se pueden identificar con facilidad por sus características macroscópicas y microscópicas. En las Figuras 2,3,4-3 se representan la microscopia obtenida de hongo entomopatógeno del género *Cordyceps* donde sus estructuras presentan características morfológicas del género descrito.



**Figura 5-3:** Especies de *Cordyceps* en Ecuador.

Fuente: (Serrano, Yamara, 2016: p. 43)

La Figura 5-3 permite observar los especímenes del género *Cordyceps* hallados en el Ecuador en un estudio realizado por Serrano Yamara en el 2016, donde se evidencia los diferentes hospedadores que puede servir de reservorio para hongos del género *Cordyceps* para su desarrollo y diferenciación de baja a alta especificidad generando la variada forma estructural característica para cada especie.



**Figura 6-3:** Insecto infectado por *Cordyceps fungus*

**Fuente:** (Rhoskyns, R, Nationalgeographic.org, 2021: p. 1)

La Figura 6-3 proporciona una evidencia de infección y propagación de un hongo del género *Cordyceps* parasitando un insecto del orden Orthoptera, también se pueden observar las estructuras externas (micelio – cuerpos fructíferos) que generan la interacción entre el insecto y el hongo entomopatógeno.



**Figura 7-3:** Especie de hongo encontrado del género *Cordyceps* en un hospedador Tettigoniidae

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021

Los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* al infectar y colonizar un insecto y utilizarlo como hospedero, generan estructuras erectas o sinemas como también pueden desarrollar estructuras ramificadas, donde en su ápice presenta estructuras reproductivas como ilustra la Figura 7-3. Las morfologías presentan similitudes descritas en estudios observados por Osorio, J (Osorio, J, 2018: p. 45) y Serrano, Y (Serrano, Yamara, 2016: p. 43).

**Tabla 2-3:** Taxonomía de la especie fúngica del género *Cordyceps*

<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Filo</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Clase</b>	<i>Sordariomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>Familia</b>	<i>Cordycipitaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Cordyceps</i> (Sung et al. 2007)

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

La Tabla 2-3 representa la taxonomía establecida para el espécimen del género *Cordyceps* estudiado según las morfologías macroscópicas y microscópicas característicos comparadas con

otros hongos del mismo género, determinando que existe una gran similitud para colocar a esta especie dentro de este grupo de hongos entomopatógenos.

### **Aislamiento y purificación de *Cordyceps***



**Figura 8-3:** Aislamiento de *Cordyceps*

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

La muestra del hongo recolectado fue aislada satisfactoriamente en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética del Centro de Investigación de la Escuela Superior Politécnica usando las técnicas de microbiología a disposición para poder obtener un aislado con el cual se desarrolló el estudio. La Figura 8-3 representa el crecimiento del hongo en PDA medio inclinado (4 días de crecimiento) y el punto de partida para sus análisis subsiguientes.



**Figura 9-3:** *Cordyceps* en PDA.

Crecimiento micelial en 8 días

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.



**Figura 10-3:** *Cordyceps* en PDA.

Crecimiento micelial en 30 días

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

La Figura 9-3 indica el crecimiento de *Cordyceps* en PDA en un tiempo de 8 días y la Figura 10-3 representa el crecimiento a los 30 días, sus características describen el desarrollo de *Cordyceps*, una vez purificado el hongo *Cordyceps* se observó el crecimiento micelial en PDA, donde el hongo crece formando micelio blanco de forma algodonosa, de borde regular, en la parte central se evidenció la presencia de aglomerados con característica sobresaliente en punta asociados a la formación de peritecios. El crecimiento radial de *Cordyceps* se ve limitado conforme avanza el tiempo, debido al consumo de nutrientes y pérdida de humedad propio del medio de cultivo, lo que limita a la maduración de los cuerpos fructíferos a estructuras de mayor biomasa.

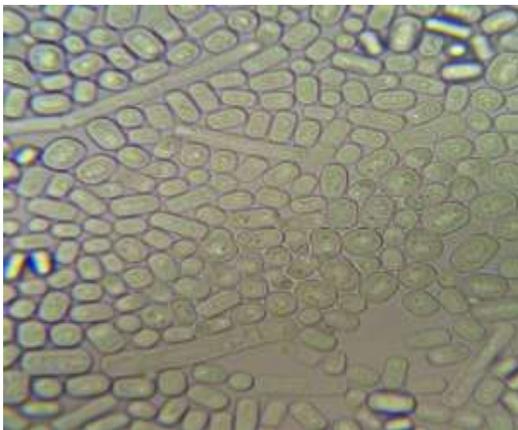
### **Morfología microscópica de *Cordyceps***

En la Figura 11-3 se pueden observar las estructuras microscópicas del hongo *Cordyceps* en tinción azul de lactofenol, este presenta una red de hifas entrelazadas que proporcionan soporte al micelio. La Figura 12-3 indica la presencia de esporas de *Cordyceps* juntas formando parte de la red micelial. Las estructuras como las ascosporas y conidios se observan en la Figura 13-3 durante el crecimiento del hongo, estas estructuras son características de este género.



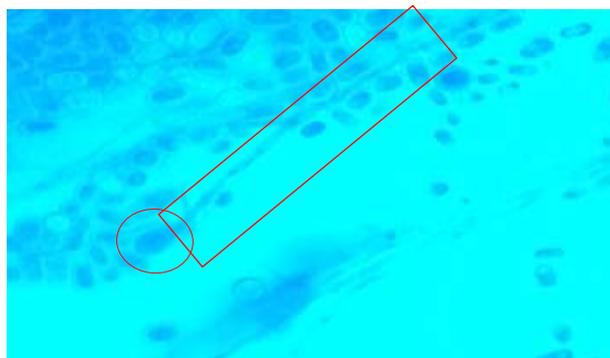
**Figura 11-3:** *Cordyceps* tinción azul de lactofenol, lente 40X

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.



**Figura 12-3:** Ascosporas fragmentadas del hongo *Cordyceps*, lente 100X

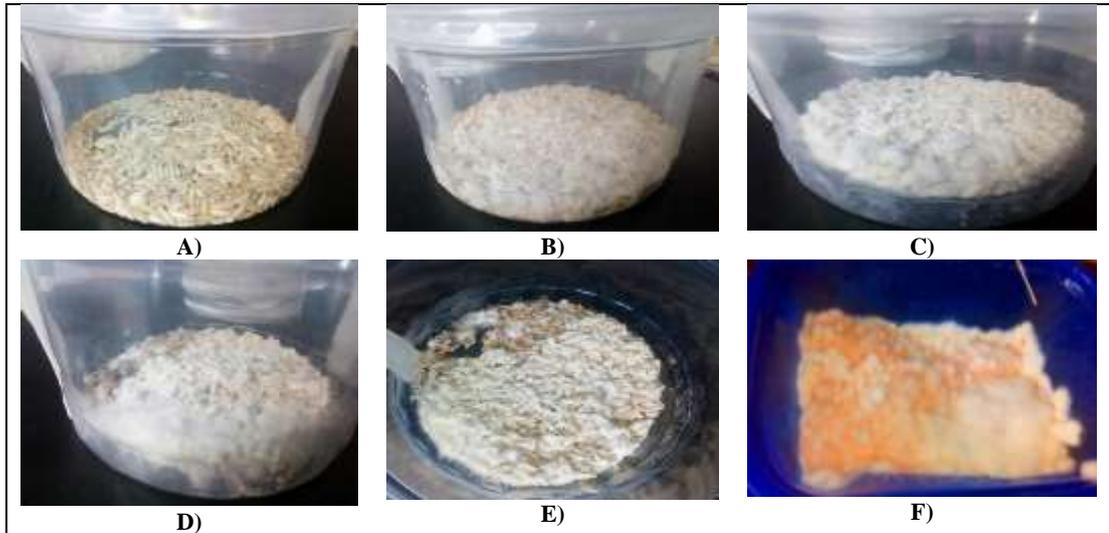
Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.



**Figura 13-3:** Ascospora y conidio del hongo *Cordyceps*, lente 40X

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

### Cultivo de *Cordyceps* en sustrato sólido

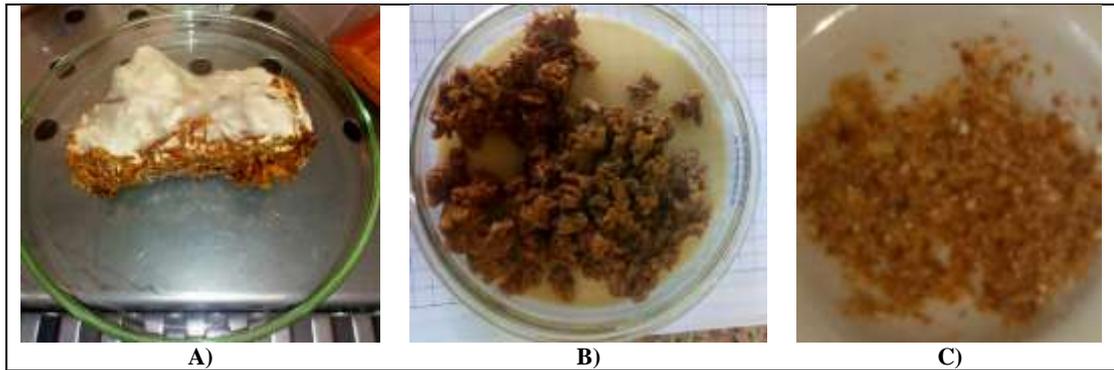


**Figura 14-3:** Cultivo de *Cordyceps* en medio sólido.

**Referencia:** A) Medio sólido a base de arroz integral, B) Crecimiento de *Cordyceps* 5 días, C) Crecimiento de *Cordyceps* 15 días, D) Crecimiento de *Cordyceps* 30 días, E) Crecimiento de *Cordyceps* 35 días, F) Crecimiento de *Cordyceps* 45 días.

**Elaborado por:** Quishpe, Josué, 2021.

Los resultados de crecimiento micelial del hongo *Cordyceps* descritos en la Figura 14-3, se evidenciaron de manera favorable en el sustrato base (arroz integral) juntamente con el caldo base que proveen una humedad del medio entre 90 – 95 %; condiciones de importancia para simular las condiciones naturales que favorezcan su crecimiento y la producción de los metabolitos secundarios. Los medios enriquecidos con materia orgánica rica en carbono y nitrógeno son fundamentales para un hongo entomopatógeno al simular el crecimiento natural en los insectos que hospedan (Shrestha et al, 2006: p. 93-99). Es de importancia considerar que la humedad relativa presente durante el crecimiento es propicia para las mejores condiciones de crecimiento del hongo *Cordyceps* ya que su ambiente natural de crecimiento es en zonas tropicales-húmedas.



**Figura 15-3:** Cultivo de *Cordyceps*

**Referencia:** A) *Cordyceps* en medio sólido 45 días de crecimiento, B) Separación del micelio formado y eliminación de remanentes del medio sólido, C) Muestra seca y pulverizada del micelio de *Cordyceps*.

**Elaborado por:** Quishpe, Josué, 2021.

Cuando el crecimiento del hongo *Cordyceps* ha llegado a su período establecido de 45 días este se prepara para ser aislado del sustrato (arroz integral), en la Figura 15-3 se establecen los resultados de la separación del micelio del hongo formado, la eliminación de restos de medio sólido, secado y pulverizado de la muestra para su posterior formulación de los extractos.

### 3.2. Propiedades físicas, control de extractos de *Cordyceps*

**Tabla 3-3:** Resultados de las propiedades físicas, control de extractos de *Cordyceps*

Características Organolépticas		Color	Olor
Extracto metanólico		Café	Picante característico al disolvente
<b>Extracción</b>			
	<b>Peso inicial Micelio seco</b>	<b>Peso final</b>	<b>% Rendimiento</b>
Extracto metanólico	6 g	0,372 g	6,2 %
<b>Parámetro</b>			
	<b>Especificación</b>	<b>Resultado</b>	
Densidad	d= g/mL	0.9831	
pH	Ácido	5.60	
Humedad	Desecación en Estufa (110 °C), 24 horas	91.41 %	
	Desecación en Termobalanza (120 °C):	86.61%	
Cenizas	Incineración en mufla, 550°C, 2 horas	2.67 %	

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

La Tabla 3-3 muestra los resultados del control de extractos. El extracto metanólico de *Cordyceps*, presentó una densidad de 0.9831 g/mL muy cercano a la densidad del agua, su pH fue ácido 5.6, debido a las condiciones de desarrollo del medio base de crecimiento con pH entre 5-6, la determinación del porcentaje de humedad en la muestra húmeda por el método de la estufa (110°C) fue de 91.41 % y por termobalanza (120°C) fue de 86.61%, las cenizas totales obtenidas permitieron determinar la cantidad de materia remanente posterior a la ignición de la materia orgánica de la muestra, estas cenizas pueden provenir de los tejidos del micelio desarrollado en un sustrato rico en materia orgánica, su valor fue de 2.67%.



**Gráfica 1-3:** Porcentaje de rendimiento en la extracción en metanol.

**Elaborado por:** Quishpe Josué, 2021.

La Grafica 3-1 expresa el porcentaje del rendimiento alcanzado durante el proceso de extracción de la droga cruda del 6% del peso inicial de la muestra de micelio seco y pulverizado.

### 3.3. Análisis de la composición química de la droga cruda de *Cordyceps*

#### 3.3.1. Tamizaje fitoquímico

**Tabla 4-3:** Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Cordyceps*.

Grupo Fitoquímico	Determinación	Extracto Metanólico
ALCALOIDES	Ensayo de Dragendorff	++
	Ensayo de Mayer	++
	Ensayo de Wagner	++
TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	Ensayo de Liebermann-Burchard	+
LÍPIDOS MONOTERPENOS	Ensayo de SUDAN III	+
QUINONAS	Ensayo de Borntrager	-
PROTEINAS Y/O AMINOÁCIDOS	Ensayo de la ninhidrina	+
FLAVONIDES	Ensayo de Shinoda	-
AZUCARES REDUCTORES	Ensayo de Fehling	-
COMPUESTOS FENÓLICOS Y/O TANINOS	Ensayo del cloruro férrico	-
RESINAS	Ensayo de resinas	-
SAPONINAS	Ensayo de la espuma	-
GLUCÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	Ensayo de Baljet	++

Indicador: (-) Negativo, (+); Escasa evidencia (++); Evidencia Moderada; (+++) Alta Evidencia.

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

En la Tabla 4-3 se encuentran expresados los resultados del análisis cualitativo mediante el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de una especie estudiada del género *Cordyceps*, entre los metabolitos secundarios encontrados se destacan como positivos los alcaloides y con menor composición triterpenos, lípidos, proteínas y glucósidos cardiotónicos.

Los metabolitos presentes en los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* descritos por Opeyemi, J y colaboradores en su revisión de usos tradicionales, fitoquímica y farmacología de género *Cordyceps* en 2018, describen la presencia de compuestos químicos como alcaloides, esteroides, afirmando que estos compuestos se encuentran presentes en el extracto fúngico de la especie del género *Cordyceps* en estudio (Opeyemi, J, et al, 2018: p. 298).

En este estudio, en el extracto metanólico no se encontraron evidencia de la presencia de compuestos químicos como quinonas, flavonoides, azúcares reductores, compuestos fenólicos, resinas, saponinas.

La interacción entre el hongo entomopatógeno y su huésped permite la expresión molecular y genética para especies del género *Cordyceps*, lo que optimiza la producción de los metabolitos secundarios, pero el crecimiento in vitro permite la producción de varios compuestos químicos de interés, pero su limitación a la fuente natural hospedadora podría evitar la producción de estos metabolitos secundarios de manera eficiente y su actividad biológica se puede ver comprometida.

### 3.3.2. Identificación de grupos funcionales en *Cordyceps*

**Tabla 5-3:** Análisis espectrofotométrico infrarrojo del micelio de *Cordyceps*

Frecuencias $\text{cm}^{-1}$	Vibraciones
2853	C-H de alcanos
1648	N-H de amina
1238	C-N de amina

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

La espectrofotometría infrarroja de una muestra de micelio seco y pulverizado cultivado en medios sintéticos permitieron la identificación de grupos funcionales del hongo del género *Cordyceps*, los que podemos observar en la Tabla 5-3 la presencia de vibraciones a cierta frecuencia, grupos alcanos con enlaces C-H con hibridación  $\text{sp}^3$  ( $2853 \text{ cm}^{-1}$ ), grupos aminos con enlaces C-N ( $1648 \text{ cm}^{-1}$ ) y N-H ( $1648 \text{ cm}^{-1}$ ), estos grupos funcionales pueden pertenecer a compuestos encontrados en el género *Cordyceps* como alcaloides y nucleósidos descritos por Olatunji (Olatunji, OJ et al, 2018: p. 293-316).

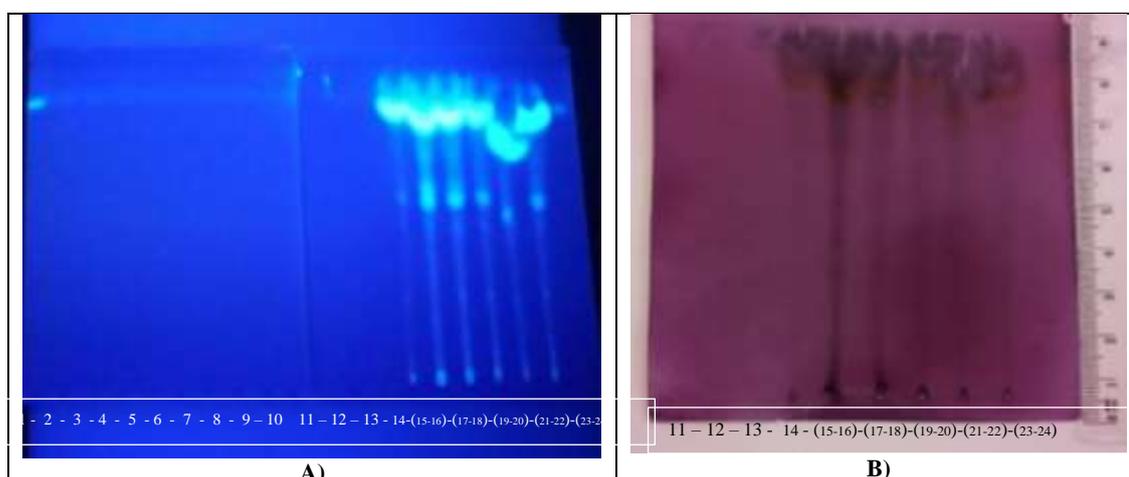
### 3.4. Resultados de Actividad Antimicrobiana del extracto de *Cordyceps*

#### 3.4.1. Evaluación de fracciones obtenidas por cromatografía en columna

Se realizó una cromatografía en capa fina para identificar los posibles compuestos químicos en el extracto de *Cordyceps*, el cromatograma evaluado permitió identificar la presencia de compuestos en las fracciones F14 – F24 expuestos en Figura 16-3,A) los que posiblemente

pueden atribuirse la actividad antimicrobiana evaluada por el método de difusión en disco frente a cepas de bacterias tipo, mientras que las primeras fracciones F1 - F13 presentaron una escasez de compuestos químicos visibles en la cromatografía en capa fina.

El extracto metanólico de *Cordyceps* presenta una buena separación de los componentes presentes con la fase móvil; n-hexano, EtOAc (1:1), lo que se evidenció gracias al revelado por medio de luz UV a 366 nm Figura 16-3, A). Los compuestos presentes en la Figura 16-3,B) gracias al revelado con el reactivo de Vainillina (1% vainillina y 10% etanol)-ácido sulfúrico predice la presencia de compuestos orgánicos aromáticos y volátiles constituidos por uniones de unidades de hidrocarburos (isopreno) en el extracto, como lo reporta Shuai-Ling Qu en “Metabolites and Their Bioactivities from the Genus *Cordyceps*” la presencia de compuestos esteroides y terpenoides característicos con posible actividad antibacteriana, antitumoral, inmunosupresor en *C. sinensis* y la presencia de nuevos compuestos en *C. militaris* con una actividad anticancerígenas (Qu SL, Li SS, Li D, Zhao PJ, 2022: p. 6-10)



**Figura 16-3:** Cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto de *Cordyceps*.

**Referencia:** A) Cromatografía de las fracciones activas del extracto metanólico de *Cordyceps*, B) Placa cromatográfica revelada con el reactivo vainillina en las fracciones activas del extracto metanólico de *Cordyceps*

**Elaborado por:** Quishpe, Josué, 2021.

### Perfil cromatográfico

Absorbente: Sílica gel (60 GF<sub>254</sub>, MERCK)

Eluyente: n-hexano, EtOAc (1:1)

Revelador: Luz UV a 366 nm

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

**Tabla 6-3:** Reporte de cromatográfico

Fracciones	Distancia de la mancha observada cm	Cálculo de Rf	Intensidad
F14	7.8	Rf = 7.8/8 = 0.98	Fuerte
	5.2	Rf = 5.2/8 = 0.65	Intermedia
F15-16	7.3	Rf = 7.3/8 = 0.92	Fuerte
	5.0	Rf = 5.0/8 = 0.63	Intermedia
F17-18	7.4	Rf = 7.4/8 = 0.93	Fuerte
	5.0	Rf = 5.0/8 = 0.63	Intermedia
F19-20	7.4	Rf = 7.4/8 = 0.93	Fuerte
	5.1	Rf = 5.1/8 = 0.64	Intermedia
F21-22	6.4	Rf = 6.4/8 = 0.80	Fuerte
	4.5	Rf = 4.5/8 = 0.56	Intermedia
F23-24	7.2	Rf = 7.2/8 = 0.90	Fuerte
	4.9	Rf = 4.9/8 = 0.61	Intermedia

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

La Tabla 6-3 expresa los Rf calculados en presencia de los posibles compuestos extraídos por un proceso de maceración y separación cromatográfica, sus valores de Rf se encuentran entre 0.56 – 0.98 para los compuestos que presentaron manchas en presencia de la luz UV a 366 nm, estos compuestos fueron afines a la fase móvil (n-hexano, EtOAc (1:1) durante la cromatografía en capa fina.

### 3.4.2. Inhibición frente a cepas bacterianas

**Tabla 7-3:** Resultados de Actividad Antimicrobiana mediante Método de difusión en discos.

	Medición de halos de inhibición (cm)			Media (cm)	Medición de halos de inhibición control positivo (cm)			Media (cm)
	Ensayos				Ensayos			
	2500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL		Cloranfenicol 30 mcg			
<i>Escherichia coli</i>	0,9 (R)	0,8 (R)	0,6 (R)	0,77	2,0 (S)	2,1 (S)	2,0 (S)	2,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,8 (R)	0,7 (R)	0,6 (R)	0,70	2,1 (S)	2,0 (S)	2,1 (S)	2,07

Referencia para cloranfenicol 30 µg/mL *E. coli* ATCC 25922: R (Resistente ≤ 12), I (Intermedia 13-17), S (Sensible ≥18).

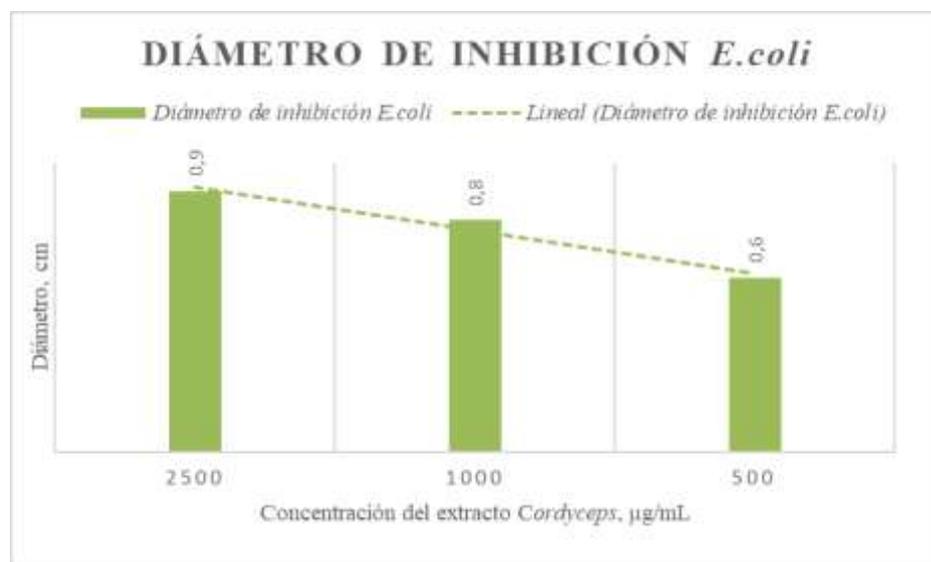
Referencia para cloranfenicol 30 µg/mL *S. aureus* ATCC 25923: R (Resistente ≤ 12), I (Intermedia 13-17), S (Sensible ≥18). (Picazo, J.2000. 12-15 pp.).

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021.

La Tabla 7-3 muestra los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto de *Cordyceps* sobre cepas bacterianas. Los resultados mostrados sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* indican una actividad inhibitoria baja en el crecimiento de estos microorganismos, los diámetros de los halos de inhibición corresponden de entre 0,9 – 0,6 medidos en centímetros

(cm) en un intervalo de concentración del extracto de 25000  $\mu\text{g/mL}$  – 500  $\mu\text{g/mL}$ , el volumen de extracto usado para esta determinación corresponde a 15  $\mu\text{L}$ /disco.

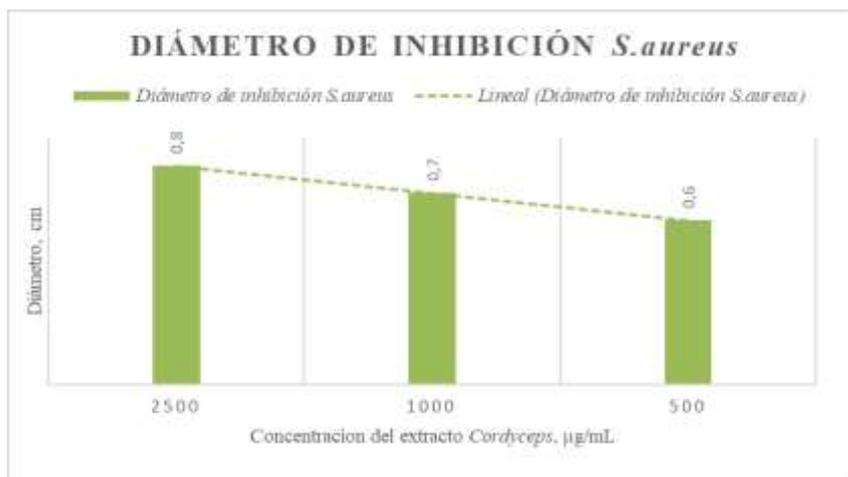
El extracto metanólico de *Cordyceps* obtenido por maceración presentó una mayor actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* con la formación de un halo máximo de inhibición de 0,9 mm, mientras que para *Staphylococcus aureus* mostró un halo de inhibición máximo de 0,8 mm a una concentración de 2500  $\mu\text{g/mL}$  del extracto de *Cordyceps*. Los resultados obtenidos en este estudio presentan similitud experimental de inhibición positiva con los estudios realizados por Zheng, H. (2006), sobre la inhibición antibacteriana de *E. coli* y *S. aureus* por medio de la actividad de la proteína antibacteriana CSAP mediante el método de Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Cordyceps sinensis*. (Zheng, H, 2006: p. 713).



**Gráfica 2-3:** Diámetro de inhibición formado para *E. coli* con respecto a la concentración del extracto de *Cordyceps*

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021

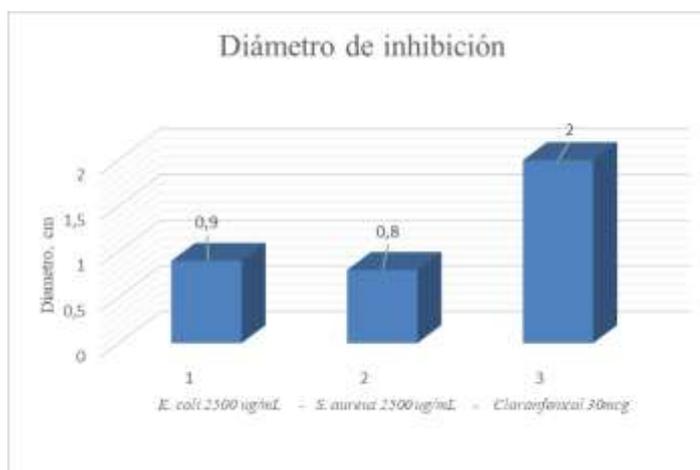
La Gráfica 2-3 indica los diámetros del halo de inhibición formados en presencia del extracto de *Cordyceps* a 2500  $\mu\text{g/mL}$ , 1000  $\mu\text{g/mL}$  y 500  $\mu\text{g/mL}$ , en donde se identifica mayor actividad antimicrobiana a mayor concentración del extracto de *Cordyceps* y su diámetro de inhibición fue mayor frente a *S. aureus*.



**Gráfica 3-3:** Diámetro de inhibición formado para *S. aureus* con respecto a la concentración del extracto de *Cordyceps*

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021

La Gráfica 3-3 indica los diámetros del halo de inhibición formados en presencia del extracto de *Cordyceps* a 2500 µg/mL, 1000 µg/mL y 500 µg/mL, en donde se identifica mayor actividad antimicrobiana a mayor concentración del extracto de *Cordyceps* y su diámetro de inhibición fue menor antes que a *E. coli*.



**Gráfica 4-3:** Diámetro de inhibición formado para *S. aureus* con respecto a la concentración del extracto de *Cordyceps*

Elaborado por: Quishpe, Josué, 2021

La interacción observada en la Grafica 4-3 representa la capacidad antimicrobiana del extracto de *Cordyceps*, se evidencia una diferente formación de halos de inhibición según la cepa bacteriana en estudio, donde existe una mayor inhibición para el representante de los microorganismos Gram negativos (*E. coli*) con formación de un mayor diámetro de inhibición que para el representante de los Gram positivos (*S. aureus*), siendo el extracto metanólico de *Cordyceps* de mayor actividad para los Gram negativos.

## CONCLUSIONES

- Se obtuvo la especie fúngica del género *Cordyceps* mediante el aislamiento y cultivo in vitro para semejar las condiciones naturales requeridas por este microorganismo para su crecimiento, también se sistematizó la técnica para su aislamiento y cultivo.
- Mediante la técnica de maceración en un solvente alcohólico en un periodo de 96 horas se logró obtener el extracto de *Cordyceps* para los análisis de la composición química y actividad antimicrobiana.
- El Tamizaje Fitoquímico permitió determinar los metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *Cordyceps* que proporcionan alguna actividad biológica a ser evaluada, tales compuestos químicos fueron: alcaloides, triterpenos, lípidos, proteínas y glucósidos cardiotónicos.
- La actividad antimicrobiana del extracto alcohólico de *Cordyceps* a diferentes concentraciones presentó un mayor efecto antimicrobiano frente a cepas de *Escherichia coli* con mejores halos de inhibición (9 mm), a una concentración de 2500 µg/mL en contraste con las cepas de *Staphylococcus aureus* determinados mediante el método de difusión en disco en medio sólido.
- En la especie fúngica del género *Cordyceps* mediante el análisis de la composición química se encontraron metabolitos de interés biológico como alcaloides y triterpenos, a los que se les atribuyen propiedades antimicrobianas descritos en sendos estudios, durante la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Cordyceps* se evidenció la formación de halos de inhibición de diámetros inferiores a 10 mm pero con la presencia de actividad positiva sobre las cepas bacterianas en estudio, debido a la escasa actividad antimicrobiana encontrada durante el estudio se concluye que los resultados obtenidos no justifican la efectividad en la actividad antimicrobiana atribuida al extracto fúngico del género *Cordyceps*.

## RECOMENDACIONES

- Es recomendable para incrementar la eficiencia de extracción en el contenido químico y su actividad biológica que se utilice el mismo solvente de extracción complementado con nuevos métodos de extracción.
- Continuar con el estudio de *Cordyceps* y de sus metabolitos que pueden llegar a determinar otras propiedades biológicas
- Evaluar la actividad antimicrobiana de *Cordyceps* frente a nuevos microorganismos patógenos y nuevos rangos de concentración.
- Durante el proceso de maceración y almacenamiento se recomienda la refrigeración para evitar alteración de los compuestos de interés químico hasta su análisis y uso.
- Se recomienda el uso de técnicas cuantitativas para cuantificar los componentes químicos que pueden producir los hongos del género *Cordyceps*.
- Analizar factores que pueden alterar o incrementar la producción de compuestos bioactivos pertenecientes a especies del género *Cordyceps*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bravo, E.** 2014. La biodiversidad en el Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana. Editorial Universitaria Abya-Yala. Quito. 2014: p.54.
- Britanialab s.a.** 2021. [en línea]. [Consulta: 10/09/2021]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070756160103.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070756160103.pdf). p.1.
- Bruneton, J.** 2001. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales., 2a.ed., Zaragoza-España., Acribia., 2001: p. 54-77.
- Canata, María et al.** 2015. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Centras de Instituto de Previsión Social en el 2012. <https://doi.org/10.18004/ped.2016.abril>. p.13-17.
- Clínica Universidad de Navarra.** 2021. Diccionario médico. Hospedador. [Consulta: 10/09/2021]. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/hospedador>.
- Corzo, A.** 2019. Técnicas de análisis en química orgánica. Cromatografía. Universidad Nacional de Santiago de Estero. Facultad de Ciencias Forestales. ISBN 978-987-1676-86-6. Serie N° 44. p.35-48.
- Chakraborty, S. Chowdhury, S. Nandi, G.** 2014. Review on Yarsagumba (*Cordyceps sinensis*) - An Exotic Medicinal Mushroom. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2014; 6(2); p.339-346.
- De la Torre, L.** 2008. Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito. 2008: p.6-8.
- Espinel, C et al.** 2018. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Capítulo 6. Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga. p.338-342.
- Cervantes,E-García, García,R-González, Salazar, M-Schettino.** 2014. Características generales de *Staphylococcus aureus*. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México (UNAM). Revista Latinoamericana de Patología Clínica. Lab 2014; 61 (1): p.28-40.

- Fianco, Marcos, Szinwelski, Neucir & Faria, Luiz RR**, 2022, Katydidids (Orthoptera: Tettigoniidae) from the Iguazu National Park, Brazil, 1-72 pp. in *Zootaxa* 5136 (1): p. 38. DOI: 10.11646/zootaxa.5136.1.1, <http://zenodo.org/record/6550041>
- García, M., D. Parra P. y P. Mena B.** 2014. El país de la biodiversidad: Ecuador. Fundación Botánica de los Andes, Ministerio del Ambiente y Fundación EcoFondo. Quito. p.318.
- Guzmán, G.**, 2011. El uso tradicional de los hongos sagrados: pasado y presente. *Etnobiología* 9. Instituto de Ecología, A.C., Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, 91070, Veracruz, México. p.1-7.
- Illana, E.** 2007. *Cordyceps sinensis*, un hongo usado en la medicina tradicional china. Departamento de. Biología Vegetal. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, *Rev Iberoam Micol.* Madrid. p.1-3.
- Ander, J.** 2019. Imagen de *Cordyceps militaris*. [en línea]. [Consulta: 10/09/2021]. Disponible en: <https://www.fungipedia.org/setas-informacion-y-consultas/19-microscopia/72281-cordyceps-militaris.html>
- Calvo, J y Martínez, L.** (2008). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Vadecilla, Santander, España. p.50. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Kuklinski, Claudia** 1999. Drogas con actividad inmunomoduladora. Polisacáridos de origen fúngico. Ediciones Omega. p.381.
- Li, S. P., Yang, F. Q., & Tsim, K. W. K.** (2006). Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), p. 1571–1584. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.046
- Miranda M, Cuéllar A.** 2001. *Farmacognosia y Productos Naturales*. Ed Félix Varela. Ciudad de La Habana. p.1590-161.
- Mittermeier, R.,P. Robles, M Hoffmann.** 2004. Hotspots, Biodiversidad amenazada II.CEMEX. México, D.F. p.390.

- Canata, M. Navarro, R. Velázquez, G. Rivelli, S. Rodríguez, F. Céspedes, A. Espínola, C. Canese, J. Guillén, R.** 2015. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatr. (Asunción)*, Vol. 43; N° 1; Abril 2016: p. 13 – 17.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador.** 2015. Quinto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Quito, Ecuador. p. 37.
- Mohd A, Syed A, Saif K, Eyad A & Amir M.** 2017. Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates, *CyTA - Journal of Food*, 15:4, p.617-621. DOI: 10.1080/19476337.2017.1325406.
- Nam, S.H., Li, C.R., Hong, I.P., Sung, K.B., Kang, S.W., Fan, M.Z. Y Z.L. Li.** 2006. Isolation and Culture of Entomopathogenic Fungus, *Cordyceps sphecocephala*. *International Journal of Industrial Entomology*. p.13. 57-61.
- O., Roskov, Y., Vandepitte, L., DeWalt, R. E., Remsen, D., Schalk, P., Orrell, T., Keping, M., Miller, J., Aalbu, R., Adlard, R., Adriaenssens, E., Aedo, C., Aesch, E., Akkari, N., Alonso-Zarazaga, M. A., Alvarez, B., Alvarez, F., Anderson, G., et al.** (2021). Tettigoniidae in Bánki, Catalogue of Life Checklist. 2021. Catalogue of Life. [en línea]. [Consulta: 12/09/2021]. Disponible en: <https://www.gbif.org/es/species/173006136>. <https://doi.org/10.48580/d4sg>
- Oh, J., Baek, Y., Kim, S., & Hwang, H.** 2008. Cells induced by polysaccharides - peptide complexes produced by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *cordyceps*.
- Olatunji, J. O., Tang, J., Tola, J., Florence A., Oluwaniyi O., Ouyang, Z.** 2018. The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Faculty of Thai Traditional Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand*. 129, p.293-316. [en línea]. [Consulta: 11/09/2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.010>.

- Osorio J.** 2018. Caracterización Morfológica de *Cordyceps sp.* (Ascomycota:Hypocreales) Aislado de una Pupa de mariposa (Insecta: Lepidoptera) del Mariposario Amaranta de Colombia, Pereira, Risaralda. Universidad de Antioquia. p.45.
- Pedraza, H,** 2013. Micoterapia: Guía de Hongos para la Salud. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina, Maestría de Medicina Alternativa Bogotá D:C, Colombia. p.13.
- Qu SL, Li SS, Li D, Zhao PJ.** 2022. Metabolites and Their Bioactivities from the Genus *Cordyceps*. *Microorganisms*. 2022. Jul 24;10(8):1489. doi: 10.3390/microorganisms10081489. PMID: 35893547; PMCID: PMC9330831. p.6-10.
- REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA** 2da Edición. Madrid- España: Ministerio de Sanidad y Consumo 2002: p. 2803.
- Rhoskyns, R.** National Geographic. Resource Library. Photograph. *Cordyceps Fungus*. [en línea]. [Consulta: 10/09/2021]. Disponible en: <https://www.nationalgeographic.org/photo/fungus-bug/#cordyceps-fungus>.
- Rojas, J,** 2016. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Cordyceps nidus* USANDO CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA Y DE CAPA DELGADA. Facultad de Ingeniería de la Universidad de los Andes. Ingeniería Química. p.18-20.
- Rubinson K.A., Rubinson J.F.,** 2000. “Análisis Instrumental”, Espectroscopias infrarroja y Raman: espectroscopias vibracionales. Ed. Pearson Educación. p.446- 458. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/29025298/Analisis-Instrumental-Judith-F-Rubinson>
- Serrano, Y.** 2016. Diversidad de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae) en el Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Escuela de Ciencias Biológicas. p.43.
- Sherstha, B.; E. Tanaka; J. G. Han; J. Oh; S. K. Han. Lee & G.** 2004. A Brief Chronicle of the Genus *Cordyceps* Fr., the Oldest Valid Genus in Cordycipitaceae (Hypocreales, Ascomycota). *Microbiology*, 42 (2): p.93-99.

- Sisalema, D.** 2013. SEPARACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE MARTIN GALVIS (*Senna multijuga*) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Escuela de Bioquímica y Farmacia. p.10-15.
- Sprecher M, Sprinson DB.** A Reinvestigation of the Structure of “Cordycepic Acid”<sup>1a</sup> The Journal of Organic Chemistry. 28: p.2490-2491. DOI: 10.1021/Jo01044A536
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B. & Spatafora, J. W.** 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology, p.57-59.
- Terrestrial Fungi,** 2022. *Cordyceps militaris*. [en línea]. [Consulta: 12/09/2021]. Disponible en: <https://www.terrestrialfungi.com/products/cordyceps-militaris-f1-hybrid-strains>
- WHO.** 2020. Resistencia a los antimicrobianos. [en línea]. [Consulta: 12/09/2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. p.1-2.
- Xuanwei Z, Zhenghua G, Ying S, Juan L and Kexuan T.** 2008. *Cordyceps fungi*: natural products, pharmacological functions and developmental products. Journal of Pharmacy and Pharmacology Volume 61, Issue 3, p.279-29. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.03.0002>.
- Zheng, H., Maoqing, Y., Liqiu, X., Wenjuan, T., Liang, L., & Guolin, Z.** 2006. Purification and characterization of an antibacterial protein from the cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 11(3), p.709–714. doi:10.1007/bf02836695



## ANEXOS

### ANEXO A: RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO



A) *Cordyceps* - *Tettigoniidae*



B) Recolección de micelio de *Cordyceps*

### ANEXO B: ESTRUCTURAS FÚNGICAS DE HONGO *CORDYCEPS*



A) Micelios-cuerpos fructíferos recolectados



B) Peritecio de hongo *Cordyceps*

### ANEXO C: CULTIVO DE *CORDYCEPS*



A) Crecimiento de *Cordyceps* en medio base



B) Crecimiento de *Cordyceps* en PDA



C) Crecimiento de *Cordyceps* en matriz proteica 15 días



D) Crecimiento de *Cordyceps* en matriz proteica 45 días

### ANEXO D: MICROSCOPIA DE *CORDYCEPS*



A) Crecimiento de *Cordyceps* en PDA, pico de flauta PDA



B) Tinción con azul de lactofenol para estructuras fúngicas de *Cordyceps*

**ANEXO E: MICELIO DE *CORDYCEPS***



A) Micelio de *Cordyceps*



B) Separación del micelio de *Cordyceps* de la matriz proteica

**ANEXO F: MÉTODO DE SECADO Y MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**



A) Porcentaje de humedad del micelio de *Cordyceps* por termobalanza



B) Sonicador para extracción de metabolitos secundarios

**ANEXO G: DETERMINACIÓN DEL PH Y FILTRACIÓN DEL EXTRACTO DE *CORDYCEPS***



A) Medición de pH de extracto alcohólico de *Cordyceps*



B) Filtrado del extracto alcohólico en poro de 0,22μm

**ANEXO H: ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA**



A) Espectrofotometría infrarroja del extracto de *Cordyceps*

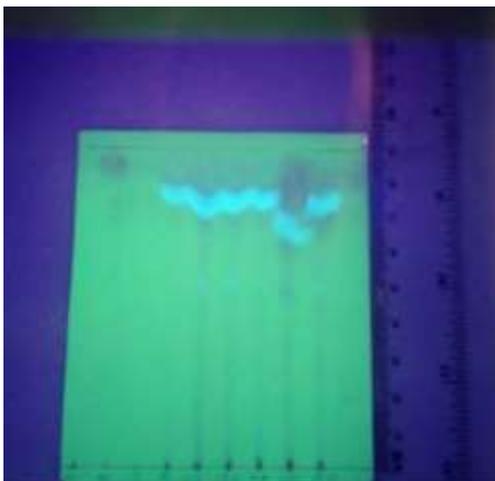


B) Espectrofotómetro IR Jasco FT/IR-4100

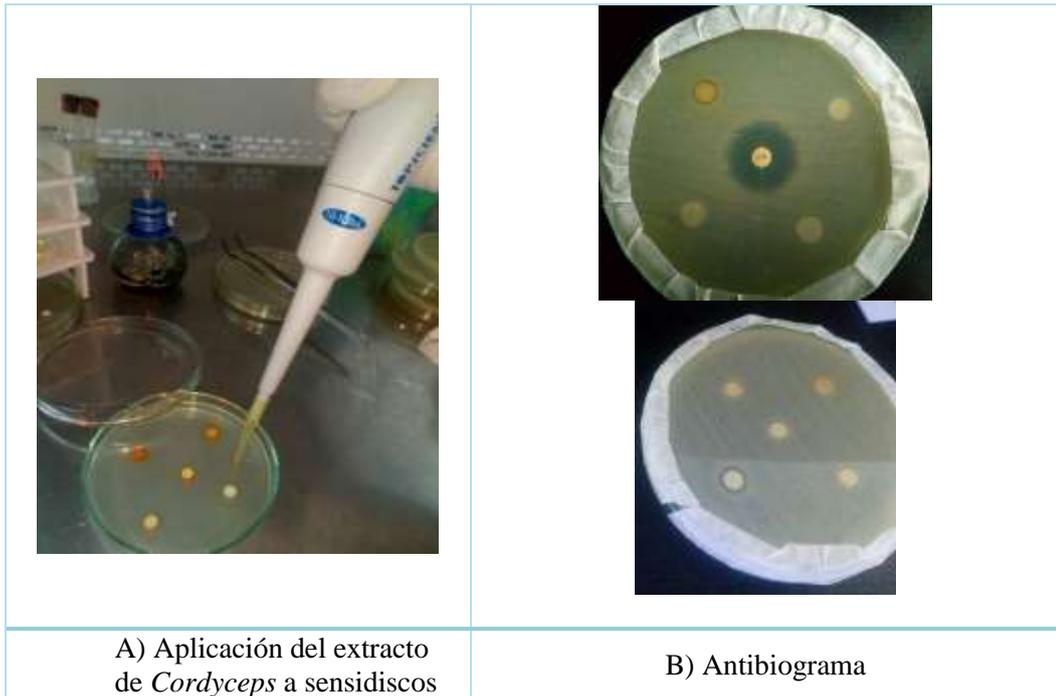
## ANEXO I: TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

	
<p>A) Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de <i>Cordyceps</i></p>	<p>B) Cromatografía en columna del extracto alcohólico de <i>Cordyceps</i></p>

## ANEXO J: CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LAS FRACCIONES ACTIVAS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *CORDYCEPS*

	
<p>A) Cromatografía de las fracciones activas del extracto metanólico de <i>Cordyceps</i></p>	<p>B) Placa cromatográfica revelada las fracciones activas del extracto metanólico de <i>Cordyceps</i></p>

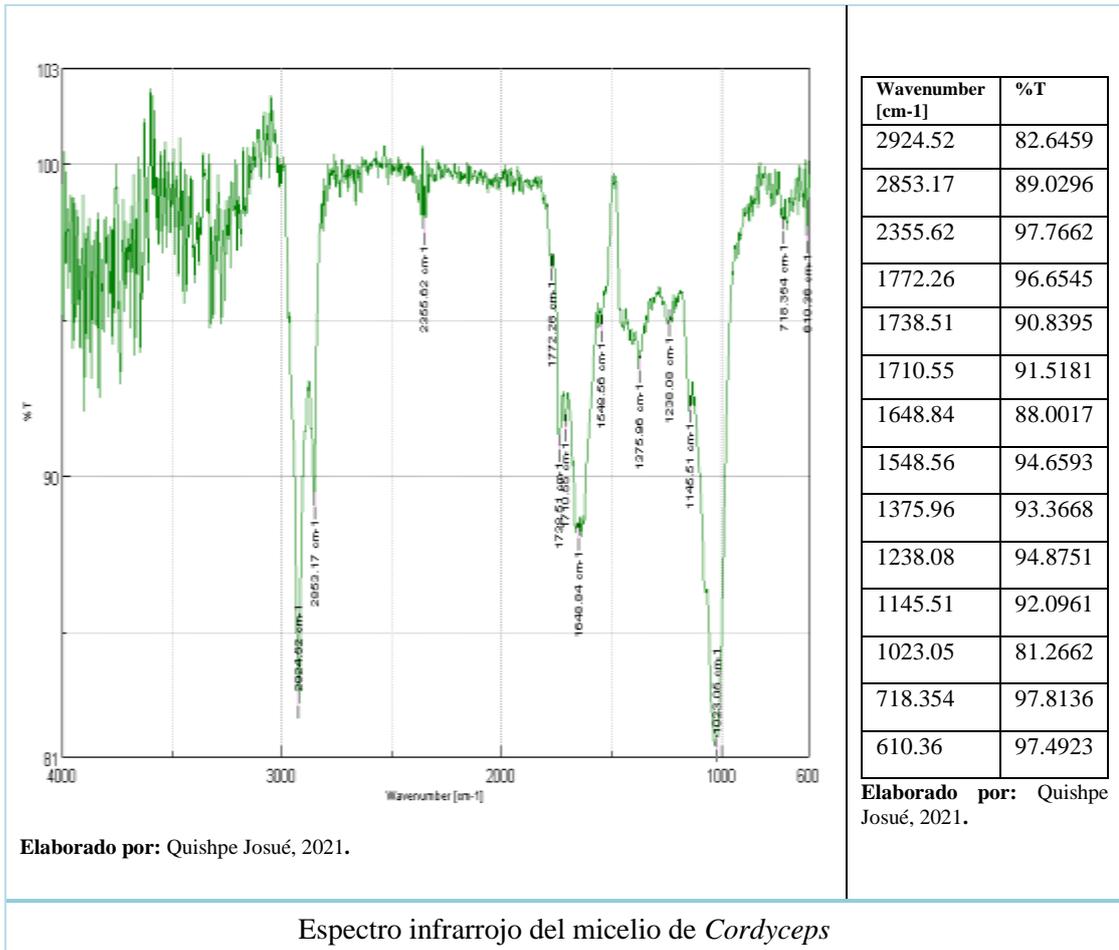
## ANEXO K: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO



A) Aplicación del extracto de *Cordyceps* a sensidiscos

B) Antibiograma

## ANEXO L: ESPECTRO INFRARROJO DEL MICELIO DE *CORDYCEPS*



Espectro infrarrojo del micelio de *Cordyceps*

**ANEXO M: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA PROTEÍNA CSAP DE *CORDYCEPS SINENSIS***

<b>Table 1 MIC of Antimicrobial Activity of CSAP</b>				
	CCTCC Number		CSAP Antimicrobial activity	MIC/10 <sup>-3</sup> g • L <sup>-1</sup>
<b>Bacteria</b>				
<i>Bacillus subtilis</i>	AB92068	G <sup>+</sup>	Trace	>100
<i>Escherichia coli</i>	AB90054	G <sup>-</sup>	+ Positive	75-100
<i>Proteus vulgaris</i>	AB91103	G <sup>-</sup>	+ Positive	75
<i>Staphylococcus aureus</i>	AB203010	G <sup>+</sup>	++ Positive	50
	AB91053	G <sup>+</sup>	+ Positive	75
	AB91118	G <sup>+</sup>	+ Positive	75
	AB91093	G <sup>+</sup>	+ Positive	75
<i>Salmonella typhi</i>	AB94010	G <sup>-</sup>	++ Positive	50
<b>Fungus</b>				
<i>Aspergillus niger</i>	AF91004		Negative	
<i>Mucor mucedo</i>	AF93229		Negative	
<i>Penicillium citrinum</i>	AF93094		Negative	
<b>Yeast</b>				
<i>Candida sp.</i>	AY91001		Negative	
<i>Hansenula anomala</i>	AY92046		Negative	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AY92042		Negative	

Positive; Trace; <2 mm inhibitory zone; +: 2-5 mm inhibitory zone; ++: 5-10 mm inhibitory zone;

Actividad antimicrobiana por la proteína CSAP derivada del micelio de *Cordyceps sinensis* (Zheng, H. 2006. 712 pp.)



epoch

Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 09 / 02 / 2023

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Quishpe Coello Luis Josué
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Bioquímica y Farmacia
<b>Título a optar:</b> Bioquímico Farmacéutico
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo

0191-DBRA-UPT-2023