

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Área Académica de Biología

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE *Ganoderma* spp.
(GANODERMATACEAE) DEL ESTADO DE HIDALGO Y
CARACTERIZACIÓN DE SUS ESTEROLES PRINCIPALES.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL ISLAS SANTILLÁN

DIRECTORES:

DRA. LETICIA ROMERO BAUTISTA

DR. J. MARTÍN TORRES VALENCIA

MINERAL DE LA REFORMA, HGO., NOVIEMBRE DE 2018



Mineral de la Reforma, Hgo., a 04 de octubre de 2018

Número de control: ICBI-D/797/2018
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

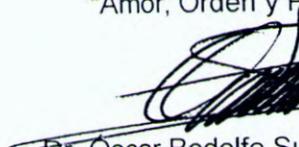
Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado al C. Miguel Ángel Islas Santillán, alumno del Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación con número de cuenta G00194, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado " Actividad antioxidante y citotóxica de *Ganoderma* spp. (Ganodermataceae) del Estado de Hidalgo y caracterización de sus esteroides principales" en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dr. J. Martín Torres Valencia
SECRETARIO	Dr. Ricardo Valenzuela Garza
VOCAL	Dra. Leticia Romero Bautista
SUPLENTE	Dr. Pablo Octavio Aguilar

Sin otro particular reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"


 Dr. Oscar Rodolfo Suárez Casillas
 Director del ICBI



GPF/LVCL

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pacuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras Mineral de la Reforma Hidalgo,
 Mexico C.P. 42154
 Telefono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2031
 Fax 2109
 direccion icbi@uaeh.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

AL COMITÉ DE SEGUIMIENTO:

- Dra. Leticia Romero Bautista
- Dr. J. Martín Torres Valencia
- Dr. Ricardo Valenzuela Garza
- Dr. Pablo Octavio Aguilar

Por dedicarme su valioso apoyo, compartir sus conocimientos, consejos y paciencia.

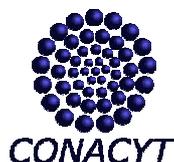
A LOS INVESTIGADORES:

- Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto (UAEH)
- Dr. Enrique Soto Eguibar (BUAP)
- Dra. Rosario Vega y Saenz de Miera (BUAP)
- Dra. Audrey Magdalena Ortega Ramírez (BUAP)
- Quim. Blanca Estela Pérez Escandón (UAEH)
- Dra. Araceli Castañeda Ovando (UAEH)
- Mtro. Octavio González Petlascalco (BUAP)
- Mtro. Mario Segura Almaráz (UAEH)
- Mtro. Antonio Álvarez Delgadillo (UAEH)
- Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera (UANL)

Por el tiempo invertido, enseñanzas y ayuda de manera incondicional en las diferentes etapas de éste proyecto.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios de Etnobotánica, Química 5 y Fisiología sensorial: Isabel, Julio, Antonio, Alexia, Martha, Adriana, Carmen, Raúl, Audrey, Laura, Lorena, Citlali, Jesua, Octavio y Nacho, a quienes agradezco los excelentes momentos compartidos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca No.389008 para la realización del doctorado.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. HIPÓTESIS	9
4. JUSTIFICACIÓN	9
5. OBJETIVOS	10
5.1 OBJETIVO GENERAL	10
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	10
6. SITIOS DE RECOLECTA	11
6.1 MUNICIPIO DE ACAXOCHITLÁN	11
6.2 MUNICIPIO DE TLANCHINOL	11
6.3 MUNICIPIO DE ZACUALTIPÁN DE ÁNGELES	12
7. MÉTODOS	13
7.1 RECOLECTA DE EJEMPLARES E IDENTIFICACIÓN	13
7.1.1 Trabajo de campo	13
7.1.2 Descripción e identificación de especies	13
7.2 AISLAMIENTO DE CEPAS.	14
7.3 PROPAGACIÓN Y CULTIVO DE MICELIO	15
7.4 PREPARACIÓN DE INÓCULO Y CULTIVO EN SUSTRATO	15
7.5 ANÁLISIS DE EXTRACTOS Y AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS	16
7.5.1 Preparación de extractos	16
7.5.2. Técnicas para la separación de compuestos	17
a) Cromatografía rápida en columna (CC-Flash)	17
b) Cromatografía en capa fina (CCF)	17
c) Resonancia magnética nuclear (RMN).	17
d) Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	18
7.5.3 Aislamiento de compuestos	18
7.6 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	21
7.7 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	22
7.8 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA	23
7.8.1. Reactivación de células	24
7.8.2. Preparación de extractos	24
7.8.3. Prueba de crecimiento celular	24
7.8.4. Medición de supervivencia celular	26
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
9. RESULTADOS	27
9.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	27
9.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS ESPECIES	28
9.2.1 <i>Ganoderma curtisii</i>	28
9.2.2 <i>Ganoderma applanatum</i>	31
9.2.3 <i>Ganoderma brownii</i>	33
9.3 AISLAMIENTO DE CEPAS	35

9.4 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO Y EN SUSTRATO	35
9.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EN <i>G. curtisii</i>	37
9.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EN <i>G. applanatum</i>	49
9.7 COMPARACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS	56
9.8 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	60
9.8.1 Actividad radicalaria Método ABTS	60
9.8.2 Cuantificación de fenoles totales Método de Folin Ciocalteau	64
9.9 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD	70
9.9.1 Línea celular CHOK-1	70
9.9.2 Línea celular CHANG	74
9.9.3 Línea celular MCF7	78
9.9.4 Línea celular MDA-MB231	82
9.9.5. Ensayos con ergosterol	86
10. DISCUSIONES	91
11. CONCLUSIONES	97
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	99
13. ANEXOS	113
14. TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ubicación de los municipios de recolecta.	12
Figura 2	Diagrama del proceso para evaluación de actividad antioxidante.	22
Figura 3	Diagrama del proceso para cuantificación de fenoles totales.	23
Figura 4	Diseño experimental para pruebas de citotoxicidad.	25
Figura 5	Basidiomas silvestres recolectados.	27
Figura 6	Corte transversal del basidioma de <i>G. curtisii</i> .	29
Figura 7	Micromorfología de <i>G. curtisii</i> .	30
Figura 8	Corte transversal del basidioma de <i>G. applanatum</i> .	31
Figura 9	Micromorfología de <i>G. applanatum</i> .	32
Figura 10	Morfología de <i>G. brownii</i> .	34
Figura 11	Micelio cultivado en medio líquido.	35
Figura 12	Cultivo de la cepa UAEH-017 (<i>G. curtisii</i>) en sustrato.	36
Figura 13	Espectros de RMN ¹ H (400MHz) en CDCl ₃ de los extractos de <i>G. curtisii</i> (GcA-b).	38
Figura 14	CCF de la primera separación de eluatos del extracto hexánico de <i>G. curtisii</i> .	39
Figura 15	Cromatografía en capa fina de las fracciones 9-31, 9-32, 9-33 y 9-34.	40
Figura 16	Cromatografía TLC de la fracción 9-33 y 9-33-7.	40
Figura 17	Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) en CDCl ₃ de las fracciones 5, 8 y 9 del extracto hexánico.	41
Figura 18	Comparación de espectros de RMN de ¹ H (400 MHz) en CDCl ₃ del ergosterol comercial y fracción 9-33-7.	42
Figura 19	Estructura química de ergosterol (1) y estelasterol (2).	43
Figura 20	Espectros de RMN ¹ H (400MHz) en CDCl ₃ de fracciones 9-33-7 B, C y E.	44
Figura 21	Espectros de RMN de ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100MHz) en CDCl ₃ 3 del estelasterol (2) (F 9-33 7 BC).	45
Figura 22	TLC de las fracciones 10, 11 y 12 en cloroformo-AcOEt 4:1	47
Figura 23	Estructura química del peróxido de ergosterilo (5 α ,8 α -epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol).	47
Figura 24	Espectros de RMN de ¹³ C (100 MHz) y ¹ H (400 MHz) en CDCl ₃ del peróxido de ergosterilo (3) (fracción 12).	48
Figura 25	Preparación TLC del precipitado de <i>G. applanatum</i> (Fpp): sin purificar (1 y 2), lavado con hexano (3 y 4).	50
Figura 26	RMN ¹ H (400MHz) en CDCl ₃ del precipitado (Fpp) de <i>G. applanatum</i> , compuesto por los esteroides 1 y 2.	51
Figura 27	CCF de las fracciones obtenidas por CC del precipitado de <i>G. applanatum</i> no depurado p(Fpp).	52
Figura 28	Cromatopla (CCF) del sobrenadante recuperado del extracto hexánico de <i>G. applanatum</i> .	52
Figura 29	Estructura química del compuesto ergosta-7,22-dien-3-ona (4).	53
Figura 30	Espectros de RMN de ¹³ C (100 MHz) y ¹ H (400 MHz) en CDCl ₃ de la cetona 4 (fracción F 4-5), extr. hex. de <i>G. applanatum</i> (GaA-b).	54
Figura 31	Análisis TLC de la fracción 8-9 del extracto hexánico de <i>G. applanatum</i> .	55
Figura 32	Perfil cromatográfico (HPLC) de los extractos hexánicos de <i>G. curtisii</i> : GcZ-b y GcT-b	56

Figura 33	Perfil cromatográfico (HPLC) de los extractos hexánicos de <i>G. curtisii</i> : GcA-b, GcA-bc y GcA-m.	57
Figura 34	Perfil cromatográfico (HPLC) de los extractos hexánicos de <i>G. applanatum</i> GaA-b y <i>G. brownii</i> GbT-b.	58
Figura 35	Actividad radicalaria de los extractos hexánicos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	61
Figura 36	Actividad radicalaria de los extractos etanólicos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	62
Figura 37	Actividad radicalaria de los extractos acuosos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	63
Figura 38	Actividad radicalaria de los extractos crudos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	64
Figura 39	Cuantificación de fenoles totales en los extractos hexánicos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	65
Figura 40	Cuantificación de fenoles totales en los extractos etanólicos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	66
Figura 41	Cuantificación de fenoles totales en los extractos acuosos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	67
Figura 42	Cuantificación de fenoles totales en los extractos crudos de <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	68
Figura 43	Análisis discriminante generalizado lineal (AFDG) de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Ganoderma</i> spp.	69
Figura 44	Morfología de la línea celular CHOK-1 en cultivo (Tomado de ATCC).	70
Figura 45	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de <i>G. applanatum</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHOK-1.	71
Figura 46	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de <i>G. curtisii</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHOK-1.	72
Figura 47	Comparación de las curvas dosis efecto (D-E) de los extractos de <i>G. applanatum</i> y <i>G. curtisii</i> , en concentraciones de 1 a 300 µg/mL frente a las células CHOK-1.	73
Figura 48	Morfología de las células CHANG en cultivo (Tomado de Cellbank).	74
Figura 49	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de <i>G. applanatum</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHANG.	75
Figura 50	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de <i>G. curtisii</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHANG.	76
Figura 51	Comparación de las curvas dosis efecto (D-E) de los extractos de <i>G. applanatum</i> y <i>G. curtisii</i> , en concentraciones de 1 a 300 µg/mL frente a células CHANG.	77
Figura 52	Morfología de la línea MCF-7 en cultivo (Tomado de ATCC).	78
Figura 53	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de <i>G. applanatum</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MCF-7.	79
Figura 54	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de <i>G. applanatum</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MCF-7.	80

Figura 55	Comparación de las curvas dosis efecto (DE) de los extractos de <i>G. applanatum</i> y <i>G. curtisii</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MCF-7.	81
Figura 56	Morfología de la línea MDA-MB 231 en cultivo (Tomado de ATCC).	82
Figura 57	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos metanólicos y hexánicos de <i>G. applanatum</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231.	83
Figura 58	Curvas dosis efecto (DE) de los extractos metanólicos y hexánicos de <i>G. curtisii</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231.	84
Figura 59	Comparación de las curvas dosis efecto (DE) de los extractos de <i>G. applanatum</i> y <i>G. curtisii</i> en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231.	85
Figura 60	Curvas dosis efecto (DE) del ergosterol en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHO-K1 y MCF-7.	87
Figura 61	Curvas dosis efecto (DE) del ergosterol en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231 y CHANG.	88
Figura 62	Comparación de las curvas dosis efecto (DE) de ergosterol en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231, MCF-7, CHANG y CHOK-1.	89
Figura 63	Comparación de supervivencia celular líneas CHOK-1 y CHANG.	90
Figura 64	Comparación de supervivencia celular líneas CHOK-1 y MCF-7.	90
Figura 65	Comparación de supervivencia celular líneas CHOK-1 y MDA-MB231.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Localidades de recolecta por municipio, indicando tipo de vegetación y altitud.	13
Tabla 2	Listado de muestras utilizadas para la preparación de los extractos.	16
Tabla 3	Cálculo de las diferentes concentraciones de los extractos a evaluar.	25
Tabla 4	Listado de especies de <i>Ganoderma</i> spp. recolectadas.	28
Tabla 5	Extractos obtenidos de basidiomas silvestres de <i>G. curtisii</i> (GcA-b).	37
Tabla 6	Fracciones obtenidas en la primera separación del extracto hexánico de <i>G. curtisii</i> por cromatografía flash (CC).	39
Tabla 7	Comparación de desplazamientos en RMN ¹ H de ergosterol.	46
Tabla 8	Comparación de desplazamientos en RMN ¹ H de estelasterol.	46
Tabla 9	Comparación de espectros de RMN de ¹ H (400 MHz) en CDCl ₃ de peróxido de ergosterol y fracción 12 del extracto hexánico de <i>G. curtisii</i>	49
Tabla 10	Comparación de desplazamientos en RMN ¹ H (5α-7-22-dien-3-ona).	53
Tabla 11	Esteroles identificados para <i>G. curtisii</i> y <i>G. applanatum</i> .	55
Tabla 12	Tiempos de retención (TR) y proporción relativa (%) de los compuestos identificados (HPLC) en <i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i> y <i>G. brownii</i> .	59
Tabla 13	Concentración efectiva 50 (CE ₅₀) de los extractos de <i>G. curtisii</i> y <i>G. applanatum</i> contra las líneas celulares CHOK-1, CHANG, MCF-7 y MDA-MB231.	86

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos tienen una naturaleza “críptica”, debido a su capacidad para expresar morfologías diferentes y aparentemente sin relación en un solo individuo y características similares en taxones con un parentesco lejano. El término críptico fue propuesto en 1942 por Ernst Mayr para referirse a poblaciones filogenéticamente distintas, capaces de reproducirse por sí mismas pero morfológicamente indistinguibles, a estos grupos de especies se le denomina "complejo", “complex” o "agregado" cuando sus poblaciones están estrechamente relacionadas y tienen un ancestro en común reciente, pero puede resultar confuso para taxones que no están íntimamente relacionados y como resultado de la convergencia no pertenecen al mismo clado ni tienen un ancestro común reciente (Crespo y Lumbsch, 2010).

Diferentes estudios en México reportan un total de 357 especies de hongos poliporoides agrupadas en 91 géneros que representan el 17% del registro global (Guzmán y Herrera, 1971; Bandala *et al.*, 1993), de los cuales para el estado de Hidalgo se conocen 76 especies (Valenzuela *et al.* 2002, 2004, 2005, 2006, 2008). Una de las familias más representativa es Ganodermataceae que se divide en cinco géneros: *Ganoderma* P. Karst 1881, *Amauroderma* Murril 1905, *Haddowia* Steyaert 1972, *Humphreya* Steyaert 1972 y *Polyporopsis* Audet 2010 (Richter *et al.*, 2014).

El género *Ganoderma* fue incorporado por Peter Adolf Karsten en 1881 considerando solamente una especie (*Polyporus lucidus*), misma que se convirtió en su holotipo, aunque William Curtis fue quien le asignó el nombre, el término “*lucidus*” (latín: brillante) fue atribuido erróneamente a Von Leysser, trascendiendo éste error en trabajos posteriores (Seo y Kirk, 2000). En 1933 Donk unifica el taxa al proponer la subfamilia Ganodermatoideae y conjuntamente lo sitúa en el rango de familia (Ganodermataceae), es hasta 1981 cuando Julich propuso nombrar al orden como Ganodermatales, sin embargo, algunos investigadores continúan utilizando Aphyllophorales de manera tradicional. Este género se ha dividido en dos grandes grupos, las especies laqueadas con superficie pilear brillante y colores amarillentos a rojizo oscuros (*G. lucidum* complex) y las especies con píleo mate no laqueado de color gris a café (*G. applanatum* complex), que corresponden respectivamente a los subgéneros *Ganoderma* y *Elfvigia* (Zheng *et al.*, 2007).

En 1953 Overholts identificó para Norteamérica cuatro especies pertenecientes al complejo *lucidum*, integrándolas al género *Polyporus*, reconociendo a *P. lucidus* y *P. tsugae* como especies distintas, pero consideró al igual que Steyaert (1972) que *Ganoderma sessile*, *G. polychromum*, *G. zonatum* y *G. sulcatum* era sinónimos o variedades de *P. lucidus* (Moncalvo y Ryvarden 1997). Moncalvo *et al.* (1995) propusieron que *G. boninense* pudiera ser el nombre correcto para las especies americanas clasificadas como *G. lucidum*, después Zhou *et al.* (2015) separó *G. curtisii* de *G. sessile* y *G. tsugae*.

En *Ganoderma* las especies son genéticamente heterogéneas, están dispuestas en grupos monofiléticos que muestran gran variación por el cruce a lo largo de numerosas generaciones y que se correlacionan por su diferente origen geográfico (Pilotti *et al.*, 2004). A pesar de ello, comparten rasgos macromorfológicos (Moncalvo *et al.*, 1995), resultando paradójico por un lado la semejanza que pueden tener los basidiomas de especies diferentes (Adaskaveg y Gilbertson, 1988), y por otro las variaciones morfológicas que ocurren en una misma especie (Hong *et al.*, 2002), debido a factores ambientales, variabilidad genética, inter-hibridación y sesgo morfológico individual, lo que dificulta su identificación (Zheng *et al.*, 2007).

Se ha observado que algunos caracteres morfológicos se modifican según las condiciones de crecimiento y etapa de desarrollo, por ejemplo en individuos jóvenes de especies laquedas la superficie es más brillante y con colores intensos en comparación con ejemplares viejos que se han expuesto a factores ambientales (lluvia, exposición al sol, polvo, ataques de insectos y algas). Así mismo, la presencia o ausencia de estípites, su tamaño y tipo de inserción, está condicionado por su exposición a la luz, niveles de CO₂ y ubicación en el hospedero: raíz, cuello de la raíz o base del tronco (Moncalvo, 2000), igualmente el color y forma de basidiosporas puede verse afectado por la latitud y la altitud (Steyaert, 1972; Chen, 1993).

La ambigüedad taxonómica se mantiene por los diferentes criterios utilizados al realizar la identificación, algunos investigadores se apoyan solamente en el hospedero específico, distribución geográfica y macro-morfología de basidiomas, otros consideran las características de las esporas como carácter taxonómico primario (Sun *et al.*, 2006; Ekanjio, 2012). Actualmente se considera que los métodos taxonómicos tradicionales basados solamente en la morfología no son concluyentes para establecer un sistema

de clasificación sólido (Hseu *et al.*, 1996, Hong *et al.*, 2002), por lo que Richter *et al.* (2014) han sugerido el uso combinado de morfología, técnicas de entrecruzamiento, métodos filogenéticos moleculares y uso de marcadores quimio-taxonómicos, con la finalidad de resolver mejor la taxonomía del género.

El número de especies reconocidas para el género *Ganoderma* varía de acuerdo a la fuente consultada, Moncalvo y Ryvarden (1997) registran 386 especies, la base de datos Index Fungorum (2017) considera 437, mientras que la base de datos de Stalpers y Stegehuis (Mycobank) disponible en el sitio web de CBS (2017) enlista 478, a pesar de éstas cifras Kirk *et al.* (2008) estiman que solamente existen 80 especies.

Se reconoce que gran número de colecciones y especies de *Ganoderma* han sido nombradas erróneamente, como se expuesto anteriormente, debido a la presencia de formas heterogéneas, dificultades taxonómicas e inconsistencias en la forma que el género se ha subdividido (Mueller *et al.* 2007), además los conceptos de género y especie se vuelven confusos, debido a similitudes encontradas con otros géneros como *Fomes* (Fr.) Fr 1849, *Polyporus* P. Micheli 1729 y *Tomophagus* Murril 1905 (Paterson, 2006).

En cuanto a su biología, se trata de especies cosmopolitas que se desarrollan en ambientes tropicales a templados, caracterizadas por desarrollar basidiomas en forma de repisa, sésiles o estipitados de consistencia de leñosa a corchosa, comúnmente cubiertos por una capa de esporas. Son hongos fitopatógenos que atacan a especies latifoliadas y en ocasiones coníferas, produciendo pudrición blanca al degradar lignina, celulosa y polisacáridos, algunos son saprófitos que degradan tocones y troncos caídos (Cibrián-Tovar *et al.*, 2007), entre las especies hospederas se encuentran *Quercus* spp. (encino), *Ulmus* spp. (olmo), *Acer* spp. (arce), *Fraxinus* spp. (fresno), *Acacia* spp., *Populus* spp. (álamo), *Abies religiosa* (abeto), *A. concolor*, *Tsuga* spp., *Cocus nucifera* (palma de coco), *Prunus pérsica* (durazno), *Pyrus communis* (pera), *Vitis* spp. (vid) y *Coffea* spp. (café), entre otras (Sánchez, 1980; Ariffin *et al.*, 2000; Staments, 2000; Pilotti *et al.*, 2004; Alvarado-Rosales *et al.*, 2007).

A lo largo de la historia, se han utilizado muchos nombres en diversas lenguas para referirse a *Ganoderma* spp., Lingzhi y Reishi (Chino); Munnertake, Mannentake y Sachitake (Japonés) y Youngzhi (Coreano), cuyo uso generalizado para las numerosas especies del complejo, impide identificarlas y validar las propiedades medicinales atribuidas (Paterson, 2006).

Ganoderma se ha estudiado ampliamente por sus propiedades antialérgicas, anticancerígenas, antitumorales, antitrombóticas y antihiperlipidémicas, principalmente. Es importante señalar que el conocimiento etnomicológico y el uso de estas especies en los países orientales persiste desde tiempos ancestrales hasta nuestros días con la prescripción y preparación de productos herbolarios y extractos para tratar diferentes afecciones (Mizuno, 1994; Seo y Kirk, 2000), de ahí la importancia de profundizar su estudio.

Hasta el momento se han registrado 20 especies del género *Ganoderma*, en casi todos los estados de la República Mexicana exceptuando Baja California Sur, siete de ellas se encuentran en el estado de Hidalgo: *G. australe*, *G. applanatum*, *G. brownii*, *G. curtisii*, *G. lobatum*, *G. oregonense* y *G. sessile*. Sin embargo, solamente se ha registrado el uso tradicional en Nuevo Necaxa (Puebla) de *G. applanatum* para el tratamiento de tiña (Vázquez-Mendoza y Valenzuela, 2012) y en Chiapas de *Ganoderma* sp. por indígenas Tzeltales para “calentar el cuerpo frío” (Guzmán, 2008).

2. ANTECEDENTES

El género *Ganoderma* se utiliza desde la antigüedad en los países asiáticos para realizar preparaciones farmacológicas. En China se tiene documentado su uso en el tratado de medicina tradicional “Nei Jing Ling Shuen” (100 a.C.) prescribiéndose como infusión para tratar diversas enfermedades. En los libros de medicina “Shen Nong Ben Cao Jing” (dinastía Han del Este 25-220 d.C.) y “Ben Cao Gang Mu” escrito por Li Shi-Zhen (1590 d.C.) se distinguen variedades de *Ganoderma* por su forma (riñón o cornamenta) y color: Akashiba (reishi rojo), Kuroshiba (reishi negro), Aoshiba (reishi azul), Shiroshiba (reishi blanco), Kishiba (reishi amarillo) y Murasakishiba (reishi púrpura) (Seo y Kirk, 2000).

De igual forma, en el “Chinese medical herbology and pharmacology” publicado en 2004, se menciona el efecto terapéutico de *G. lucidum* como antineoplásico al aumentar los monocitos, macrófagos y linfocitos T; su efecto cardiovascular al incrementar las contracciones cardíacas, disminuir la presión arterial e incrementar la resistencia del músculo cardíaco a la hipoxia; se resalta su capacidad antibiótica al inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Bacillus dysenteriae*, *Pseudomonas* spp., *Pneumococcus* spp. y *Streptococcus* spp.; así como propiedades hepatoprotectoras, antidiabéticas, antitusivas, expectorantes, sedantes, analgésicas y antihistamínicas, e incluye investigaciones sobre su efecto en padecimientos como neurastenia, hiperlipidemia, leucopenia y problemas hepáticos crónicos (Chen y Chen, 2004).

Numerosos estudios han corroborado la actividad antibacteriana de los extractos de *Ganoderma* spp. frente a cepas de *Nebsiella pneumoniae* (Quereshi *et al.*, 2010) y *Staphylococcus aureus* (Prasad y Wesely, 2008); se ha confirmado su eficacia como antiinflamatorio (Stavinoha *et al.* 1995) y su capacidad antioxidante (Chuang *et al.*, 2013). Por otra parte, El-Mekawy y colaboradores (1998) probaron que algunos compuestos inhiben la multiplicación de VIH-1, ampliando el campo de investigación terapéutico por su efecto antiviral.

A partir de basidiomas de *G. tsugae* y *G. lucidum*, se identificó una macromolécula combinada de polisacáridos y quitina, llamada sacchaquitina, que probó su eficacia para regenerar la piel al promover la angiogénesis y la formación de tejido granular (Chuang *et al.*, 2013), pudiendo utilizarse como sustituto de piel artificial para tratar lesiones por congelamiento, quemaduras y diversos problemas dermatológicos (Chen y Chen, 2004).

Se han publicado diferentes estudios en relación a su capacidad antioxidante, como los realizados por Mau *et al.* (2005 a, b) y Tseng *et al.* (2008) en los que evalúan la actividad antioxidante con el método de dienos conjugados, el poder reductor con el método de Oyaizu y la capacidad radicalaria con el método DPPH, comparando extractos acuosos, extractos metanólicos y polisacáridos obtenidos de basidiomas maduros e inmaduros cultivados y micelio de *G. tsugae*. Por otra parte Chen *et al.* (2008) probaron con polisacáridos provenientes de basidiomas cultivados de *G. atrum* evaluando el efecto radicalario con el método DPPH. Mientras que Saltarelli *et al.* (2009, 2015) realizan una caracterización bioquímica y miden la actividad del micelio de *G. lucidum* y *G. resinaceum* determinando fenoles totales y capacidad radicalaria con el método DPPH, del mismo modo Kalyoncu *et al.* (2010) compararon el micelio de 21 especies de hongos silvestres incluyendo *G. lucidum*. Smina y colaboradores (2011) experimentaron con la fracción triterpénica de *G. lucidum* utilizando métodos *in-vitro* e *in-vivo* y Kozarski *et al.* (2011) con la fracción polisacárida de cuatro hongos medicinales incluido *G. lucidum*; Ćilerdžić *et al.* (2014) evaluaron basidiomas cultivados de *G. lucidum*, por su parte Nagaraj *et al.* (2014) y Acharya *et al.* (2015) evaluaron basidiomas silvestres de *G. applanatum*. En trabajos mas recientes Singdevsachan *et al.* (2017) compararon la composición química, el contenido de fenoles totales y flavonoides, la capacidad antioxidante total y la actividad radicalaria (ABTS y DPPH) de extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de basidiomas silvestres de *G. applanatum*, *G. lipsiense*, *G. chaliceum* y *G. tsugae*; Tamrakar *et al.* (2016) estudiaron la actividad antioxidante y el perfil fenólico de 62 especies de Nepal incluidas *Ganoderma* sp, *G. lingzhi*, *G. endochroum* y *G. multipileum*, evaluando los extractos etanólicos y acuosos de basidiomas silvestres. En México se tienen algunos trabajos como el de Garza *et al.* (2006) que evalúa la actividad pro-oxidante mediante el método de Bass y la citotoxicidad de los extractos acuosos obtenidos del micelio de cuatro especies del noreste de México entre ellas *G. applanatum*; Huerta *et al.* (2016) evaluaron la actividad radicalaria con el método DDPH y cuantificaron polifenoles totales de extractos etanólicos e hidroalcohólicos de basidiomas silvestres de *G. curtisii* del estado de Michoacán.

El estudio fitoquímico del género *Ganoderma* en las últimas cuatro décadas ha conducido al aislamiento de 430 compuestos (Trigos y Medellin, 2011; Baby *et al.*,

2015), la mayoría de investigaciones se han centrado en el complejo *lucidum* y en menor proporción al complejo *applanatum* (Trigos y Medellín, 2011). Los compuestos identificados corresponden principalmente a dos grupos: derivados de lanosterol y polisacáridos (Cole y Schweikert, 2003; Paterson, 2006).

Los derivados de lanosterol con esqueleto tipo lanostano incluyen 380 terpenoides y triterpenoides (Lindequist, 1995), 98 son ácidos ganodéricos (Kubota *et al.*, 1982; Kohda *et al.*, 1985, El-Mekkaywy *et al.*, 1998; Baby *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2009), 30 esteroides (Mizuno, 1994; Paterson, 2006; Baby *et al.*, 2015) como el ergosterol (ergosta-5,7,22E-trien-3 β -ol), peróxido de ergosterol (5 α ,8 α -epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol), acetato de ergosterol (Ergosta-5,7,22-trien-3- β -il acetato), cerevisterol (Ergosta-7,22E-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol), estelasterol (Ergosta-7,22-dien-3 β -ol), fungisterol (Ergosta-7-en-3 β -ol), ganoderiol A, B, D y F, ganodermediol o ganoderol B (Lanosta-7,9(11),24-trien-3,26-diol9), ganodermanonol (26-Hidroxi-lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona), además lanostenoides, aldehídos, alcoholes, ésteres, glucósidos, lactonas, cetonas, ácidos lucidénicos, triterpenos (Kim y Kim, 2002), meroterpenoides, farnesil hidroquinonas (ganomicinas A y B), sesquiterpenoides, alcaloides, benzofuranos de prenil hidroquinona, derivados de benzopiran-4-ona y bencenoides (Mothana *et al.*, 2000; Baby *et al.*, 2015).

También se han descrito más de 200 polisacáridos bioactivos obtenidos de fracciones polares a partir de basidiomas, esporas y micelio producido en cultivo sumergido (Huie y Di, 2004), principalmente glucanos (Miyazaki y Nishijima 1982), α y β -glucanos (Lindequist, 1995), β -D-glucanos, como el zimosano y curdlano (Miyazaki y Nishijima, 1982; Mizuno, 1994; Wasser, 2005; Paterson, 2006), heteroglucanos PL-1 y PL-2, homoglucono PL-3, Ganoderanos A, B y C insolubles en agua (Ríos-Cañavate, 2008). Otros forman heteropolisacáridos solubles en agua (Nie *et al.*, 2013) combinados en diferentes tipos de enlaces glucosídicos y peptídicos con glucosa, manosa, galactosa, fucosa, xilosa y arabinosa, también se pueden encontrar como glucoconjugados (proteoglucanos y glucoproteínas), unidos a proteínas y péptidos formando glicoproteínas en complejos polisacárido-proteína, glucano-proteína y heteroglicano-proteína, así como, glicopéptidos y proteoglicanos (Chen *et al.*, 2008; Wang y Zhang, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Moradali *et al.*, 2007).

De igual forma, éstos compuestos tienen propiedades antibacterianas, antialérgicas (Mizuno, 1994; Shiao, 2003), antitumorales (Mizuno, 1994; Gan *et al.*, 1998; Shiao, 2003), antiinflamatorias (Mizuno, 1994), antihipertensiva (Morigiwa *et al.*, 1986), anti-

trombosis y antihiperlipidémica, entre otras (Mizuno, 1994). Los β -D-Glucanos previenen la oncogénesis y metástasis indirectamente, al activar la respuesta inmune del organismo y estimular las células NK (NKC natural killer cells), linfocitos B, T y macrófagos, incrementando la producción de citocinas (interleucinas, interferones y factor de necrosis tumoral), que inducen la necrosis de células cancerosas (Wang *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 2003 y Wasser, 2005), e inhiben la apoptosis de neutrófilos humanos (Hsu *et al.*, 2002). Se ha comprobado que los β -D-Glucanos obtenidos de micelio por fermentación, inducen la síntesis del factor de necrosis tumoral en cantidades similares a las del medicamento “Romurtide” suministrado a pacientes que reciben radioterapia y quimioterapia (Berovic *et al.*, 2003). Kim y Kim (1999) observaron que los polisacáridos hidrosolubles extraídos de basidiomas contribuyen a prevenir daños en el DNA ocasionado por radicales libres y radiaciones UV, corroborando su efecto antioxidante y efecto radioprotector.

Entre las investigaciones más destacadas sobresalen la inducción de apoptosis en células cancerosas de leucemia, linfomas y mielomas (Müller *et al.*, 2006); bioensayos para evaluar el efecto del ácido ganodérico en el crecimiento celular de cáncer de hígado, pulmón y estómago (Chung *et al.*, 2001) y en la citotoxicidad de linfocitos T contra células tumorales (Cao y Lin, 2003).

Los experimentos con extractos de esporas y basidiomas de *G. lucidum* (Sliva, *et al.*, 2002), evidenciaron la inhibición de la actividad de los factores de transcripción en células de cáncer de mama y próstata metastásicas impidiendo su migración. En 2005, Stanley y colaboradores investigaron la inducción de apoptosis, la inhibición en la propagación celular y la eliminación de migración de celular en cáncer de próstata, mieloma, linfoma y leucemia; mientras que Müller *et al.* (2006) y Xie *et al.* (2006) estudiaron la actividad antioxidante y la inhibición de la proliferación celular en cáncer colorrectal. También se han desarrollado métodos de cultivo para obtener compuestos bioactivos, como la fermentación sumergida para producir ácido ganodérico y polisacáridos (Fang y Zhong, 2002), y la adición de etanol para activar el crecimiento micelial e inducir la producción de polisacáridos (Yang *et al.*, 2004).

3. HIPÓTESIS

Los antecedentes de estudios biológicos y químicos sobre especies de *Ganoderma* han evidenciado la presencia de metabolitos con importante actividad biológica, entre ellas la citotóxica, por lo que el análisis químico de los extractos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii* conducirá al aislamiento y caracterización de compuestos que tienen propiedades anti-oxidantes y un efecto citotóxico contra células de cáncer.

4. JUSTIFICACIÓN

Las especies fúngicas poseen potencial para la obtención de alimentos nutraceuticos y productos nutraceuticos, debido a la presencia de importantes principios activos que les confieren propiedades terapéuticas.

En las últimas décadas ha incrementado el interés por el estudio de hongos medicinales, China, Japón, Corea y Estados Unidos realizan investigaciones químicas y biomédicas, para aislar e identificar metabolitos secundarios, evaluar sus propiedades inmunomoduladoras, anti-tumorales, cardiovasculares, anti-virales, anti-bacterianas y confirmar su efecto en padecimientos de alto impacto para la salud de la población mundial como son hipertensión, diabetes, cáncer, hepatitis y VIH, entre otras.

Ganoderma es uno de los géneros más utilizados en éste sentido, lo que ha llevado a la comercialización de diferentes productos y ha estimulado la realización de estudios acerca de la composición química de las especies que integran éste complejo, además de bioensayos que permitan demostrar los beneficios atribuidos.

México cuenta con 20 especies de éste género que no han sido suficientemente estudiadas, por esta razón se considera necesario ampliar el estudio químico de las mismas y sus posibles propiedades terapéuticas para el tratamiento de diferentes tipos de tumores malignos, considerando que los cánceres de mama, próstata, hígado, estómago y útero ocupan las principales causas de mortandad en nuestro país.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar metabolitos bio-activos presentes en especies nativas del género *Ganoderma* mediante el estudio químico de sus extractos e investigar su actividad anti-oxidante y citotóxica a través de bioensayos con la finalidad de contribuir al conocimiento de compuestos de interés.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar los compuestos mayoritarios presentes en extractos obtenidos a partir de basidiomas de *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, mediante técnicas de cromatografía y espectrometría.
2. Comparar la actividad anti-oxidante y cuantificar los polifenoles totales, de extractos etanólicos, acuosos y hexánicos de basidiomas silvestres, micelio y basidiomas cultivados de *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*.
3. Evaluar la actividad citotóxica de extractos hexánicos y metanólicos de basidiomas silvestres de *G. curtisii* y *G. applanatum*, por medio de bioensayos con diferentes líneas celulares.

6. SITIOS DE RECOLECTA

6.1 MUNICIPIO DE ACAXOCHITLÁN

Localizado al sureste del estado de Hidalgo en la Región del Valle de Tulancingo, entre los 20°04' y 20°16' de latitud norte y los 98°06' y 98°18' de longitud oeste, a una altitud que varía de 1,200 a 2,800 msnm. Forma parte de las provincias fisiográficas: Eje Neovolcánico (92%) y Sierra Madre Oriental (8%). Limita al norte, este y sur con el estado de Puebla, al sur con el Municipio de Cuauhtepéc de Hinojosa y al oeste con los municipios de Cuauhtepéc de Hinojosa, Tulancingo de Bravo y Metepec (INEGI, 2009) (Figura 1). El clima de acuerdo a la clasificación de Köppen modificada por García es templado húmedo con lluvias todo el año C(fm)b(e)g, con un promedio de lluvia invernal > 18 mm, verano fresco largo, temperatura media del mes más caliente entre 6.5 y 22°C, extremoso con oscilación entre 7 y 14°C y marcha de temperatura tipo Ganges. Rango de precipitación es de 700-1600 mm y el rango de temperatura de 12-16°C. La vegetación está compuesta por bosques de *Quercus rugosa* y *Q. laurina*, bosques de *Pinus-Quercus* y bosques de *Pinus*, encontrando poblaciones naturales de *Pinus montezumae* y *P. teocote*, así como reforestaciones monotípicas de *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* (García, 1973). Las localidades de recolecta fueron Los Reyes y Venta Quemada (Tabla 1).

6.2 MUNICIPIO DE TLANCHINOL

Se encuentra al norte del estado en la región Sierra Alta, pertenece a la provincia fisiográfica Sierra Madre Oriental, forma parte de la Cuenca del río Pánuco y la Subcuenca del Río Moctezuma, entre los 20° 59' de latitud norte y los 98° 39' de longitud oeste, con una altitud entre 259 y 1,559 msnm. Colinda al norte con el estado de San Luis Potosí; al sur con el municipio de Calnali; al este con los municipios de Huazalingo y Huejutla; al oeste con el municipio de Lolotla (Figura 1). El clima de acuerdo a la clasificación de Köppen es Cb(fm)(i)gw" semicálido, el más cálido de los templados C, con temperatura media anual mayor de 18°C; verano fresco largo y lluvias todo el año; por ciento de lluvia invernal menor de 18 mm de la total anual; con poca oscilación térmica; marcha anual de la temperatura tipo Ganges y canícula (García, 1973). La vegetación característica es bosque mesófilo de montaña, con

manchones de selva mediana subperennifolia en sierras, mesetas y valles. La localidad en donde se recolectó fue Rancho Cuatempa (Tabla 1).

6.3 MUNICIPIO DE ZACUALTIPÁN DE ÁNGELES

Situado al noreste del estado en la región conocida como Sierra Alta, en la parte meridional de la provincia fisiográfica Sierra Madre Oriental, en los 20° 38' de latitud norte y 98° 39' de longitud oeste, con una altitud entre 551 y 2176 msnm. Colinda al norte con el municipio de Tianguistengo y el estado de Veracruz; al sur con el municipio de Metzquititlán; al este con el estado de Veracruz y al oeste con los municipios de Metzquititlán y Xochicoatlán (Figura 1). El clima de acuerdo a la clasificación de Köppen es C(w₂)big templado subhúmedo, el más húmedo de los templados subhúmedos con lluvias en verano; cociente P/T >55; verano fresco largo, temperatura media del mes más caliente entre 6.5 y 22 °C; isothermal, oscilación <5°C; marcha anual de la temperatura tipo Ganges. La vegetación se compone de bosques de *Pinus* y *Pinus-Quercus* las especies principales son *Pinus gregii*, *P. patula* y *P. teocote* combinados con *Quercus rugosa*, *Q. sartorii* y *Q. obtusata* (encino), además de *Juniperus* sp. (tascate) y *Alnus* sp. (abedul). En algunas áreas se encuentran manchones de bosque mesófilo de montaña y relictos boscosos de *Fagus grandifolia var. mexicana* (García, 1973). La recolecta de ejemplares se realizó en La Mojonera (Tabla 1).



Figura 1. Ubicación de los municipios de recolecta.

7. MÉTODOS

7.1. RECOLECTA DE EJEMPLARES E IDENTIFICACIÓN

La recolecta del material biológico, se realizó en los municipios de Acaxochitlán, Tlanchinol y Zacualtipán, estado de Hidalgo, en bosque de *Pinus-Quercus* (B.PQ), bosque mesófilo de montaña (B.MM) y bosque de *Fagus* (B.F) respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Localidades de recolecta por municipio, indicando tipo de vegetación y altitud.

LOCALIDAD	MUNICIPIO	VEGETACIÓN	UBICACIÓN	ALTITUD (msnm)
Los Reyes	Acaxochitlán	BQP	20° 09' 17"; 98° 09' 52"	2252
Venta Quemada	Acaxochitlán	BQ	20° 15' 03"; 98° 18' 68"	2200
Rancho Cuatempa	Tlanchinol	BMM	20° 59' 04"; 98° 37' 28"	1474
La Mojonera	Zacualtipán	BF	20° 37' 82"; 98° 36' 91"	2012

7.1.1 Trabajo de campo.

Se realizó la búsqueda directa de ejemplares en la base de troncos, tocones y árboles caídos, los basidiomas se extrajeron con cuchillo, se limpiaron con brocha y se envolvieron en papel encerado, asimismo se tomaron muestras de los hospederos para su identificación. Se realizó una descripción general de las especies, anotando los datos de recolección (localidad, fecha, coordenadas, altitud, tipo de vegetación, sustrato), morfología (tamaño, color y olor), nombre del recolector y observaciones, adicionalmente se tomaron fotografías.

7.1.2. Descripción e identificación de especies.

El trabajo de gabinete se realizó en el Laboratorio de Etnobotánica, los especímenes fueron descritos de acuerdo con las características macromorfológicas del basidioma: disposición del píleo, tamaño, forma, color, textura y consistencia, tipo de margen, permanencia de brillo y cutícula, estructura y tamaño del contexto; presencia de estípite (tipo, tamaño y color); color del himenio, estructura y tamaño de

los tubos, tipo y tamaño de poros, conteo de poros, el color se refirió con las tablas de Kornerup y Wanscher (1981). Para la descripción micromorfológica, se realizaron cortes transversales y longitudinales del píleo, cutícula, contexto, himenio y estípite (Largent *et al.*, 1977), observándose las características de las hifas, forma, color, tipo de sistema hifal y presencia de fíbulas. Se hicieron preparaciones temporales mediante cortes histológicos del basidioma, el tejido obtenido se hidrató con alcohol al 70%, agregándose hidróxido de potasio (KOH) al 5% y reactivo de Melzer determinar el tipo de reacción: dextrinoide (se vuelven rojizas o marrones), amiloide (cambian a gris o azul oscuros) o inhamiloide (sin reacción). También se realizaron preparaciones con las esporas para describir sus características (tamaño, forma, color, tipo de ápice, ornamentaciones), se midieron 30 esporas de cada ejemplar a lo largo (L) y ancho (A) para calcular el coeficiente Q (L/A) y determinar a que tipo de esporas correspondían (Largent *et al.*, 1977).

Para la determinación taxonómica se utilizaron técnicas propuestas para macromicetos por Largent (1973) y Largent *et al.* (1977) y para poliporoides por Gilbertson y Ryvarden (1986) y Ryvarden (1991, 2000). Así mismo, se siguieron las claves de identificación para *Ganoderma* propuestas por Ryvarden y Gilbertson (1993), Cibrian-Tovar *et al.* (2007) y Torres *et al.* (2015).

El material fue desecado y etiquetado, un ejemplar de cada especie se depositó en la colección de hongos “Dr. Gastón Guzmán Huerta” del herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional, con las claves IslasGA10 (*G. applanatum*), IslasGA14 (*G. curtisii*), IslasGAB20 (*G. brownii*), IslasGCT36 (*G. curtisii*), IslasGCZ28 (*G. curtisii*). El resto del material se trituró en un molino de manera manual y se utilizó para la preparación de los extractos (Tabla 2).

7.2. AISLAMIENTO DE CEPAS

El aislamiento de cepas se realizó mediante propagación somática, utilizando cajas Petri de 85 mm con medio de cultivo malta-levadura-peptona-agar (MYPA) (Shoji, 1999; Postemsky *et al.*, 2006), esterilizado en autoclave durante 20 minutos (15 lbs de presión y 121°C), suplementado con 3 ppm de benomil y 10 ppm de aureomicina para prevenir el crecimiento de micromicetos y bacterias (Stalpers, 1978).

Se realizó un corte longitudinal en el píleo, para tomar un fragmento interno del contexto que fue colocado en el centro de una caja Petri preparada con medio de

cultivo. Las cajas rotuladas (clave de cepa, fecha de siembra y medio de cultivo), se sellaron con parafilm y se incubaron en oscuridad a 25°C durante 2 semanas, revisando diariamente el crecimiento micelial para detectar y eliminar cajas contaminadas (Gaitán *et al.*, 2002). Las cepas obtenidas se mantuvieron en refrigeración en el Laboratorio de Etnobotánica de la UAEH, asignándole las claves UAEH0017 (*G. curtisii*), UAEH0030 (*G. applanatum*) y UAEH0026 (*G. brownii*).

7.3. PROPAGACIÓN Y CULTIVO DE MICELIO

Las cepas obtenidas fueron propagadas en cajas con medio MYPA y llevadas a cultivo líquido con medio MYP (extracto de malta, extracto de levadura y peptona de caseína), en frascos de vidrio de 100 mL colocando 25 mL del medio y esterilizando a 15 lbs de presión, 121°C, durante 15 minutos. Una vez fríos se inocularon con 1 cm² de la cepa y se incubaron en oscuridad a 25°C durante 2 semanas. Transcurrido el periodo de incubación, se retiró la masa micelial, se enjuagó con agua destilada para eliminar residuos de medio y se deshidrató a una temperatura no mayor a 40°C en condiciones de oscuridad. Las muestras obtenidas se molieron en seco en licuadora y la harina resultante se utilizó en la preparación de los diferentes extractos (Tabla 2).

7.4 PREPARACIÓN DE INÓCULO Y CULTIVO EN SUSTRATO

Para el inóculo se colocaron 200 g de sorgo hidratado en bolsas de polipapel y se esterilizó en autoclave (15 lbs de presión, 121°C, 45 min). Una vez frías se sembraron con las cepas previamente propagadas y se incubaron a una temperatura de 25°C en oscuridad durante 30 días.

Para el cultivo sólido se utilizó como sustrato una mezcla de aserrín de encino suplementado con salvado (9:1) hidratado durante 12 horas. Se colocaron 500 g de sustrato en bolsas de polipapel y se esterizaron durante 2 horas (15 lbs de presión y 121°C), una vez enfriado se sembraron 50 g de inóculo por bolsa y se inició la incubación a 25°C en condiciones de oscuridad, hasta que el micelio cubrió por completo el sustrato (40 a 60 días), en esta etapa se sometieron a condiciones de luz y humedad para estimular la aparición de primordios, los basidiomas maduros fueron cosechados y deshidratados a temperatura ambiente y molidos manualmente para preparar extractos.

7.5 ANÁLISIS DE EXTRACTOS Y ASILAMIENTO DE SUSTANCIAS

7.5.1 Preparación de extractos

Se realizó una extracción secuencial utilizando como disolventes hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). En un matr az se colocaron 500 g de muestra molida (Tabla 2) y se maceró en hexano (2 L) durante dos semanas, cada extracto se filtró al vacío con papel Whatman no. 1, se concentró a baja presión en un rotavapor y se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Las muestras se secaron a temperatura ambiente con el fin de evaporar los restos del disolvente y ser utilizadas en una segunda extracción con AcOEt siguiendo el proceso anterior y finalmente para una tercera extracción con MeOH hasta agotamiento.

Tabla 2. Listado de muestras utilizadas para la preparación de los extractos (b=basidioma silvestre, bc=basidioma cultivado, m=micelio).

Especie	Procedencia	Muestra	Clave herbario/cepario	Clave de muestra
<i>G. curtisii</i>	Acaxochitlán	Basidioma (silvestre)	IslasGA14	GcA-b
		Basidioma (cultivado)		GcA-bc
		Micelio (cepa)	UAEH0017	GcA-m
<i>G. curtisii</i>	Tlanchinol	Basidioma (silvestre)	IslasGCT36	GcT-b
<i>G. curtisii</i>	Zacualtipán	Basidioma (silvestre)	IslasGCZ28	GcZ-b
<i>G. brownii</i>	Tlanchinol	Basidioma (silvestre)	IslasGAB20	GbT-b
		Micelio (cepa)	UAEH0026	GbT-m
<i>G. applanatum</i>	Acaxochitlán	Basidioma (silvestre)	IslasGA10	GaA-b
		Micelio (cepa)	UAE0030	GaA-m

7.5.2 Técnicas para la separación de compuestos

a) Cromatografía rápida en columna (CC FLASH)

La partición de los extractos se realizó mediante cromatografía en columna (CC), con la técnica de cromatografía rápida (flash) (Still *et al.*, 1978), utilizando columnas de vidrio de 50 y 20 mm Ø por 60 cm de alto, empaquetadas con gel de sílice Merck 60 (Aldrich 200-425 mesh ASTM) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano-AcOEt (7:3, 4:1, 1:1). Se colectaron fracciones de 50 mL, las cuales se analizaron por RMN de ^1H . Aquellas que mostraron compuestos de nuestro interés fueron seleccionadas para continuar con su purificación usando esta misma técnica.

b) Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizaron placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 Merck soportada en placas de aluminio de 2.5 x 6 cm y 5 x 6 cm, para determinar las mezclas de disolventes adecuadas que se utilizarían en las separaciones por CC. Se empleó como revelador luz UV con longitud de onda corta (264 nm), longitud de onda larga (356 nm) y sulfato cérico (IV) amoniacal.

c) Resonancia magnética nuclear (RMN)

La caracterización de compuestos se realizó con los espectrómetros Bruker Ascend 400 y Varian VNMRS 400, para obtener espectros ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz, en soluciones de CDCl_3 , metanol- d_4 y D_2O , usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los datos obtenidos se procesaron y analizaron con el programa MestReNova ver 7.1, incluyendo los experimentos gCOSy, gHSQC y gHMBC, los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

d) Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Los perfiles cromatográficos de los extractos hexánicos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii* (silvestres y cultivados) se obtuvieron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo Perkin Elmer Series 200 equipado con detector de UV/Vis, utilizando una columna preparativa SunFire Silica OBD, 100 Å, 5 µm, 19 x 250 mm. Para preparar las muestras se disolvieron 10 mg de los extractos hexánicos en una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1, 1 mL) y se utilizaron como referencia los compuestos **1**, **2** y **4** aislados previamente; sin embargo, el compuesto **3** no se pudo utilizar debido a su descomposición.

Se realizó una elución en gradiente con hexano (disolvente A) y AcOEt (disolvente B), bajo las siguientes condiciones experimentales: se inyectaron 100 µL de muestra a una concentración de 10 mg/mL, se eluyó con los disolventes A (65%) y B (35%) durante 12 min, después se realizó un gradiente de A (0%) → B (100%) durante 25 min y finalmente con A (60%) y B (40%), a 400 Psi y una velocidad de elución de 5 mL/min. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 300 nm a 25°C y los tiempos de retención se compararon con los compuestos **1**, **2** y **4** aislados en éste trabajo y analizados bajo las mismas condiciones.

7.5.3. Aislamiento de compuestos

Durante la evaporación del extracto hexánico de *G. curtisii* (GcA-b) se formó un precipitado cristalino que fue aislado por decantación (6.5 mg) y al analizarse por RMN de ¹H reveló estar conformado por dos compuestos esteroideos: ergosterol (**1**) y estelasterol (**2**) con una proporción relativa de 85:15. La solución decantada del extracto hexánico se separó por CC (columna de 50 mm Ø), utilizando como disolvente hexano-AcOEt (4:1) colectando 13 fracciones de 50 mL. A partir de la fracción 12 se obtuvo peróxido de ergosterol (**3**), como un sólido amorfo de color ligeramente naranja (47.4 mg). La fracción 9 (313 mg) se purificó por CC (columna de 20 mm Ø), en hexano-AcOEt (4:1 y 1:1) y se colectaron 34 fracciones de 20 mL, de las fracciones 32 y 33 eluidas con hexano-AcOEt (1:1), se obtuvo una mezcla de los esteroides **1** y **2**, mientras que en la fracción 34 (20 mg) se aisló ergosterol (**1**). La fracción 33 (190 mg) se recromatografió con hexano-AcOEt (7:3), CHCl₃ y acetona, colectando 26 eluatos de 20 mL, en la fracción 7 (81.4 mg) nuevamente se tuvieron los esteroides **1** y **2**, después

de re-cristalizarla con CHCl₃-MeOH se consiguió separar el compuesto **2** con restos del ergosterol, como un sólido de color amarillo claro (16.4 mg).

Para *G. applanatum* (GaA-b) se prepararon extractos con hexano y acetato de etilo (0.967 g y 1.16 g), al analizarlos mediante RMN se determinó que su composición era similar a los de *G. curtisii*. De la fracción hexánica se obtuvo un precipitado (130 mg) que mostró estar conformado por los compuestos **1** y **2** en una proporción relativa de 70:30 (RMN de ¹H), este precipitado se purificó por CC utilizando hexano-AcOEt (4:1), resultando 24 fracciones (20 mL c/u), aislandose de las fracciones 12–16 el compuesto **1** (80 mg) La otra parte del extracto hexánico que no precipitó, se separó por CC (columna 50 mm Ø) empleando hexano-AcOEt (4:1) obteniendo 15 fracciones (50 mLc/u), las fracciones 4 y 5 (137 mg) se purificaron por CC (columna 20 mm Ø), con hexano-AcOEt (4:1) y se colectaron 20 fracciones (20 mL c/u), de la fracción 5 se obtuvo 5 α -ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**) (50 mg). Se reunieron las fracciones 8 y 9 de la primera columna (380 mg) para purificarlas en CC con hexano-AcOEt (4:1), consiguiendo 20 fracciones de 20 mL, al analizar por RMN de ¹H las fracciones 12–13 (222 mg) se confirmó la presencia del estero **2**, con restos **3** y **1**, mientras que la fracción 19 contenía el compuesto **3** (12.9 mg).

Ergosterol (1): Sólido cristalino, punto de fusión = 155–157 °C. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): 5.57 (1H, dd, *J* = 5.6, 2.4 Hz, H-6), 5.38 (1H, dt, *J* = 5.6, 2.7 Hz, H-7), 5.23 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.1 Hz, H-23), 5.17 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.6 Hz, H-22), 3.64 (1H, tt, *J* = 11.4, 4.3 Hz, H-3), 2.47 (1H, ddd, *J* = 14.3, 4.9, 2.4 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, dd a, *J* = 14.4, 13.7 Hz, H-4 β), 1.03 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-21), 0.95 (3H, s, Me-19), 0.91 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-28), 0.83 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Me-26), 0.81 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Me-27), 0.63 (3H, s, Me-18). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 141.3 (C-8), 139.7 (C-5), 135.5 (C-22), 131.9 (C-23), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 70.4 (C-3), 55.7 (C-17), 54.5 (C-14), 46.2 (C-9), 42.8 (C-13, C-24), 40.8 (C-4), 40.4 (C-20), 39.1 (C-12), 38.4 (C-1), 37.0 (C10), 33.1 (C-25), 32.0 (C-2), 28.3 (C-16), 23.0 (C-11), 21.1 (C-15, C-21), 19.9 (C-27), 19.6 (C-26), 17.6 (C-28), 16.3 (C-19), 12.0 (C-18).

Estelasterol (2): Sólido cristalino, punto de fusión = 173–176°C. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): 5.21 (1H, dd, *J* = 15.4, 7.1 Hz, H-23), 5.16 (1H, dd, *J* = 15.4, 7.7 Hz, H-22), 5.15 (1H, m, H-7), 3.60 (1H, tt, *J* = 11.0, 4.5 Hz, H-3), 1.00 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-21), 0.91 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-28), 0.83 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, Me-26), 0.81 (3H, d, *J*

= 6.6 Hz, Me-27), 0.79 (3H, s, Me-19), 0.54 (3H, s, Me-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 139.5 (C-8), 135.6 (C-22), 131.8 (C-23), 117.4 (C-7), 71.0 (C-3), 55.2 (C-17), 51.1 (C-14), 49.4 (C-9), 43.3 (C-13), 42.8 (C-24), 40.5 (C-20), 40.2 (C-5), 39.4 (C-12), 37.1 (C-1), 34.2 (C-10), 33.1 (C-25), 31.4 (C-6), 29.6 (C-16), 28.1 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 21.1 (C-21), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28), 13.0 (C-19), 12.1 (C-18).

Peróxido de ergosterilo (3): Polvo amorfo ligeramente amarillo, punto de fusión = 150–153 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 6.50 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-7), 6.24 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6), 5.22 (1H, dd, J = 15.2, 7.4 Hz, H-23), 5.14 (1H, dd, J = 15.2, 8.4 Hz, H-22), 3.97 (1H, tt, J = 11.4, 5.1 Hz, H-3), 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-21), 0.90 (3H, d, J = 6.8 Hz, Me-28), 0.88 (3H, s, Me-19), 0.83 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me-27), 0.82 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-26). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 135.4 (C-6), 135.2 (C-22), 132.3 (C-23), 130.7 (C-7), 82.1 (C-5), 79.4 (C-8), 66.4 (C-3), 56.2 (C-17), 51.7 (C-14), 51.0 (C-9), 44.5 (C-13), 42.7 (C-24), 39.7 (C-20), 39.3 (C-12), 36.9 (C-4, C-10), 34.7 (C-1), 33.0 (C-25), 30.1 (C-2), 28.6 (C-16), 23.4 (C-15), 20.9 (C-21), 20.6 (C-11), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 18.2 (C-19), 17.5 (C-28), 12.9 (C-18).

5 α -Ergosta-7,22-dien-3-ona (4): Sólido cristalino ligeramente amarillo, punto de fusión = 170–173 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 5.22 (1H, dd, J = 7.1, 15.3 Hz, H-23), 5.18 (1H, m, H-7), 5.16 (1H, dd, J = 7.6, 15.3 Hz, H-22), 2.43 (1H, td, J = 14.5, 6.0 Hz, H-2 β), 1.03 (3H, d, J = 6.5 Hz, Me-21), 1.02 (3H, s, Me-19), 0.92 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me-28), 0.84 (3H, d, J = 6.3 Hz, Me-26), 0.82 (3H, d, J = 6.3 Hz, Me-27), 0.58 (3H, s, Me-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 212.0 (C-3), 139.5 (C-8), 135.6 (C-22), 131.9 (C-23), 117.0 (C-7), 55.9 (C-17), 55.0 (C-14), 48.8 (C-9), 44.2 (C-4), 43.3 (C-13), 42.9 (C-24), 42.8 (C-2), 40.5 (C-20), 39.3 (C-12), 38.8 (C-5), 38.1 (C-1), 34.4 (C-10), 33.1 (C-25), 30.0 (C-6), 28.1 (C-16), 22.9 (C-15), 21.7 (C-11), 21.1 (C-21), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28), 12.5 (C-19), 12.1 (C-18).

Ácido oleico y ácido linoleico: Líquido viscoso ligeramente amarillo. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 5.34 (m, H-9, H-10, H-12, H-13), 2.77 (t, J = 6.2 Hz, H-11, ácido linoleico), 2.35 (t, J = 7.5 Hz, H-2), 2.02 (m, H-8, H-11, H-14), 1.63 (quint. J = 7.2 Hz, H-3), 1.31 y 1.25 (s a, H-4–H-7, H-12–H-17 y/o H-15–H-17), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, H-18). Ácido oleico, RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 178.7 (C-1), 130.0, 129.7 (C-9, C-10),

33.8 (C-2), 31.9, 29.7, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 27.2, 24.7, 22.7, (C-3–C-8, C-11–C-17), 14.1 (C-18).

7.6 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para realizar las pruebas de actividad antioxidante se prepararon extractos etanólicos y hexánicos por maceración con agitación magnética (5g de muestra en 100 mL de disolvente) durante 24 hs en condiciones de oscuridad y extractos acuosos por infusión (5 g de muestra en 100 mL de agua destilada) en ebullición durante 10 minutos. Los extractos se filtraron con papel Whatman No. 1 y se realizaron diluciones al 5 y 10%.

La capacidad antioxidante se evaluó con el método ABTS desarrollado por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS^{•+} se obtuvo por la reacción de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfónico (ABTS) (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) en 5 mL de agua desionizada, en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente por un periodo de 12 a 16 hs antes de su uso, posteriormente se diluyó un 25% con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.60 (± 0.1) a una longitud de máxima absorción de 734 nm. Para la curva de calibración se preparó un blanco de solución estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) 1mM (2.5 mg en 10 mL de etanol), a partir de la cual se hicieron diferentes concentraciones en un intervalo de 10-50 μ M. Se colocaron 1000 μ L de radical ABTS^{•+} en una celda espectrofotométrica y se agregaron 100 μ L de las concentraciones de Trolox, transcurridos seis minutos se tomaron las lecturas de absorbancia, utilizando un espectrofotómetro marca Jenway 6405UV/Vis a 734 nm (Figura 2).

Los extractos a evaluar se diluyeron con etanol en una proporción 1:10 y 1:5, colocando 100 μ L de cada muestra en una celda espectrofotométrica y agregando 1000 μ L de radical ABTS^{•+}, se agitó e inmediatamente se midió la absorbancia a 734 nm cada minuto durante 10 minutos por triplicado, los resultados obtenidos se expresaron en mg equivalentes Trolox por gramo de muestra (mg Trolox/g).

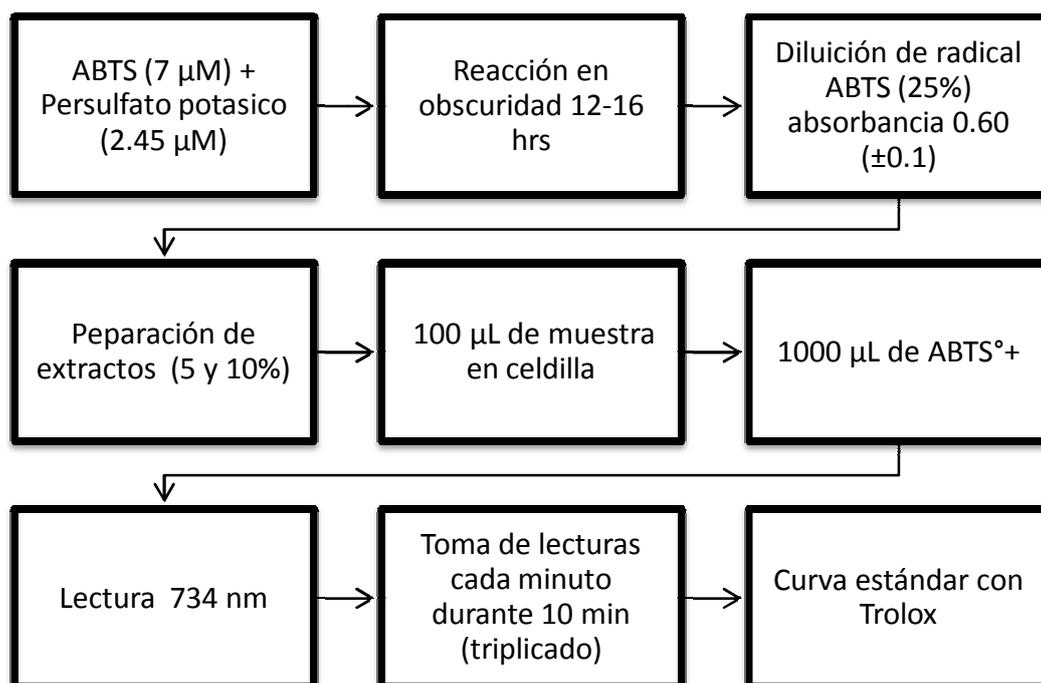


Figura 2. Diagrama del proceso para evaluación de actividad antioxidante.

7.7 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

La cuantificación de fenoles totales se realizó con el método estandarizado Folin-Ciocalteu (F-C) (Singleton, *et al.*, 1999), utilizando un buffer de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 4% en agua destilada. Para la curva de calibración se utilizó como referencia una solución de ácido gálico 2.5 mM, a partir de la cual se prepararon concentraciones en un intervalo entre 20 y 100 μM . Se colocaron 1 mL de cada concentración de ácido gálico en diferentes matraces que se aforaron con agua destilada a un volumen de 10 mL y se calentaron en baño María a 50°C durante 10 min, finalmente se tomaron las lecturas de absorbancia por triplicado a una longitud de onda de 765 nm.

Las muestras se analizaron siguiendo el procedimiento anterior sustituyendo el patrón de ácido gálico por 1 mL del extracto a evaluar, se agregó 1 mL del reactivo Folin, 4 mL de la solución de Na_2CO_3 y se aforó a 10 mL con agua destilada, calentándose en baño María a 50°C durante 10 min, se colocó 1 mL de cada preparación en una celda espectrofotométrica y se tomaron lecturas de la absorbancia por triplicado a 765 nm. El contenido de polifenoles totales se calculó usando la curva patrón de ácido gálico y los

resultados se presentaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g) (Figura 3).

Los datos se estandarizaron mediante la siguiente fórmula:

$$CR = \frac{\left(\frac{A - b}{m}\right) * PM}{C} = \frac{mg \text{ de referencia}}{g \text{ de muestra}}$$

En donde CR= concentración del referente, A= absorbancia, m= pendiente de la curva patrón, b= ordenada al origen de la curva patrón, PM= peso molecular del compuesto de referencia (g/mol) y C= concentración de la muestra (g/mL).

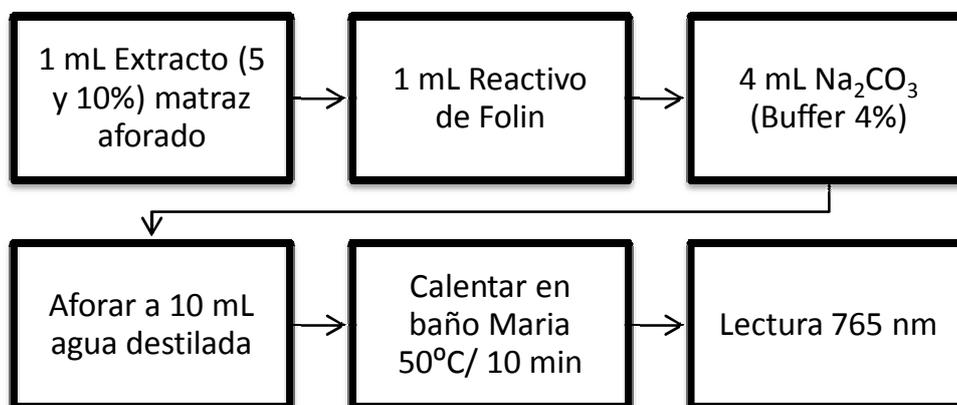


Figura 3. Diagrama del proceso para cuantificación de fenoles totales.

7.8 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

Para los ensayos de actividad citotóxica se utilizaron líneas celulares de cancer de mama MDA-MB231 (estrógeno independiente altamente invasivas) y MCF-7 (estrógeno dependiente poco invasivas), células humanas de riñon Chang-HeLA (hibridoma de células de riñon con cáncer cervicouterino) y como control células CHOK-1 (células epiteliales sanas de ovario de hámster) ampliamente utilizadas en pruebas de citotoxicidad y daño citogenético, siguiendo el método MTT propuesto por Mosmann (1983), que se describe a a continuación.

7.8.1. Reactivación de células

Las células se descongelaron en baño María a 37°C, dos horas después se cambió el medio por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino), para eliminar DMSO residual (dimetilsulfoxido). Se incubaron durante 24 hs a 37°C y 5% CO₂, con un recambio de medio a las 48 hs, transcurrido ese tiempo, las células se disociaron con tripsina, se centrifugaron a 800 r.p.m. durante 5 minutos y se re-suspendieron en 4 mL de medio fresco.

Para determinar la concentración en la cual se obtiene una confluencia del 80% después de 48 hs de incubación, se tomaron alícuotas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µL, para sembrarlas en una caja de 24 pozos, completando el volumen con medio de cultivo a 2 mL.

7.8.2. Preparación de extractos

Los extractos hexánicos y metanólicos de *G. curstii* y *G. applanatum* se resuspendieron en una solución de DMSO (0.2%) y etanol, preparando 5 mL de solución madre a una concentración de 2000 µg/mL, a partir de la cual se ajustaron las concentraciones finales a evaluar (300, 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5 y 1 µg/mL).

Se realizó una prueba de esterilidad a los extractos, para descartar presencia de contaminantes biológicos, se tomaron 25 µL de extracto, se mezclaron en 2 mL de medio DMEM y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas, transcurrido éste tiempo se observó al microscopio la posible presencia de contaminación.

7.8.3. Prueba de crecimiento celular

Las células se sembraron en placas de 24 pozos (Figura 4), colocando en cada pocillo 50 µL del cultivo celular a una densidad de 230,000 cel/mL, agregando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino) y el extracto a evaluar, de manera que el volumen final del pocillo fuera de 2 mL (Tabla 3). Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas, para permitir que los extractos interactuaran con las células y posteriormente determinar la viabilidad celular, midiendo la actividad metabólica mitocondrial usando una prueba de toxicidad con MTT (Metiltetrazolio). Cada ensayo se realizó por triplicado, teniendo

como control positivo células no tratadas y como control negativo detergente Tritón (1%).

Tabla 3. Cálculo de las diferentes concentraciones de los extractos a evaluar.

Concentración final $\mu\text{g/mL}$	Cultivo celular μl	Medio de cultivo μl	Extracto μl	Vol. final μl
300		1650	300	
200		1750	200	
150		1800	150	
100		1850	100	
50	50	1900	50	2000
30		1920	30	
20		1930	20	
10		1940	10	
5		1945	5	
1		1949	1	

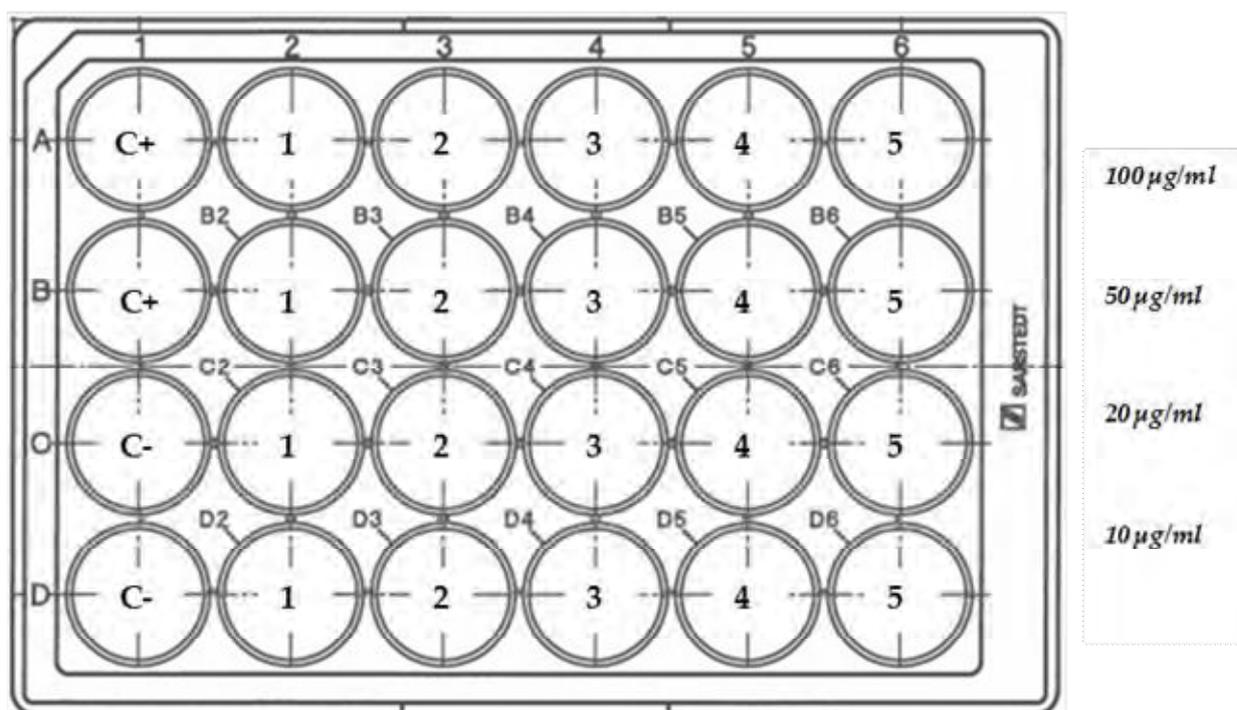


Figura 4. Diseño experimental para pruebas de citotoxicidad. Columna 1 (controles), columnas 2, 3, 4, 5 y 6 (extractos), filas A, B y C (concentraciones).

7.8.4. Medición de supervivencia celular

El medio de cultivo contenido de los pocillos fue retirado y sustituido por 1.8 mL de medio DMEM nuevo, libre de SFB (Suero Fetal Bovino), se añadieron 200 µL de Metiltetrazolio (MTT) a una concentración final de 0.5 mg/mL, las placas se incubaron por 4 horas para permitir la formación de cristales de formazán al interior de las mitocondrias. Posteriormente se retiró todo el medio y se agregaron 2 mL de DMSO, las placas de cultivo se colocaron en un agitador orbital durante 10 minutos para permitir la dilución de los cristales, finalmente se realizó la lectura de densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm, calculando el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula:

$$\% \textit{Viabilidad} = \frac{(\textit{DO células tratadas})(100)}{\textit{DO células control}}$$

Los valores de comparación se hicieron sobre una base de 50% de inhibición de crecimiento (CE₅₀) en células tratadas con los agentes específicos.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de la actividad antioxidante expresados en mgTrolox/g de muestra y del contenido de polifenoles totales expresados en GAEG/g de muestra se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se compararon las medias mediante una prueba de Tuckey ($p < 0.05$), de igual manera se realizó un análisis discriminante generalizado lineal (AFDG), con los datos de actividad antioxidante expresados en mgTrolox/g de muestra y con la concentración de fenoles totales expresados en mg EAG/g de muestra, de los extractos etanólicos y acuosos. Para los datos de citotoxicidad se realizaron pruebas T, análisis de varianza (ANOVA) para conocer si existían diferencias significativas entre líneas celulares y tratamientos y se calculó la CE₅₀, con los programas estadísticos Origin Pro, SPSS Statistics y SigmaPlot.

9. RESULTADOS

9.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Se realizaron un total de ocho salidas de campo durante el periodo comprendido de noviembre de 2014 a febrero de 2015, en cuatro localidades de los municipios de Acaxochitlán, Zacualtipán y Tlanchinol identificándose 3 especies del género *Ganoderma*: *G. curtisii* se ubicó en bosques de *Quercus* (B.Q), *Pinus-Quercus* (B.PQ) y *Fagus* (B.F) entre los 1476 y 2252 msnm, *G. applanatum* en bosque de *Pinus-Quercus* (B.PQ) a 2251 msnm y *G. brownii* en bosque mesófilo de montaña (B.MM) entre los 1412 y 1474 msnm (Tabla 4, Figura 5).

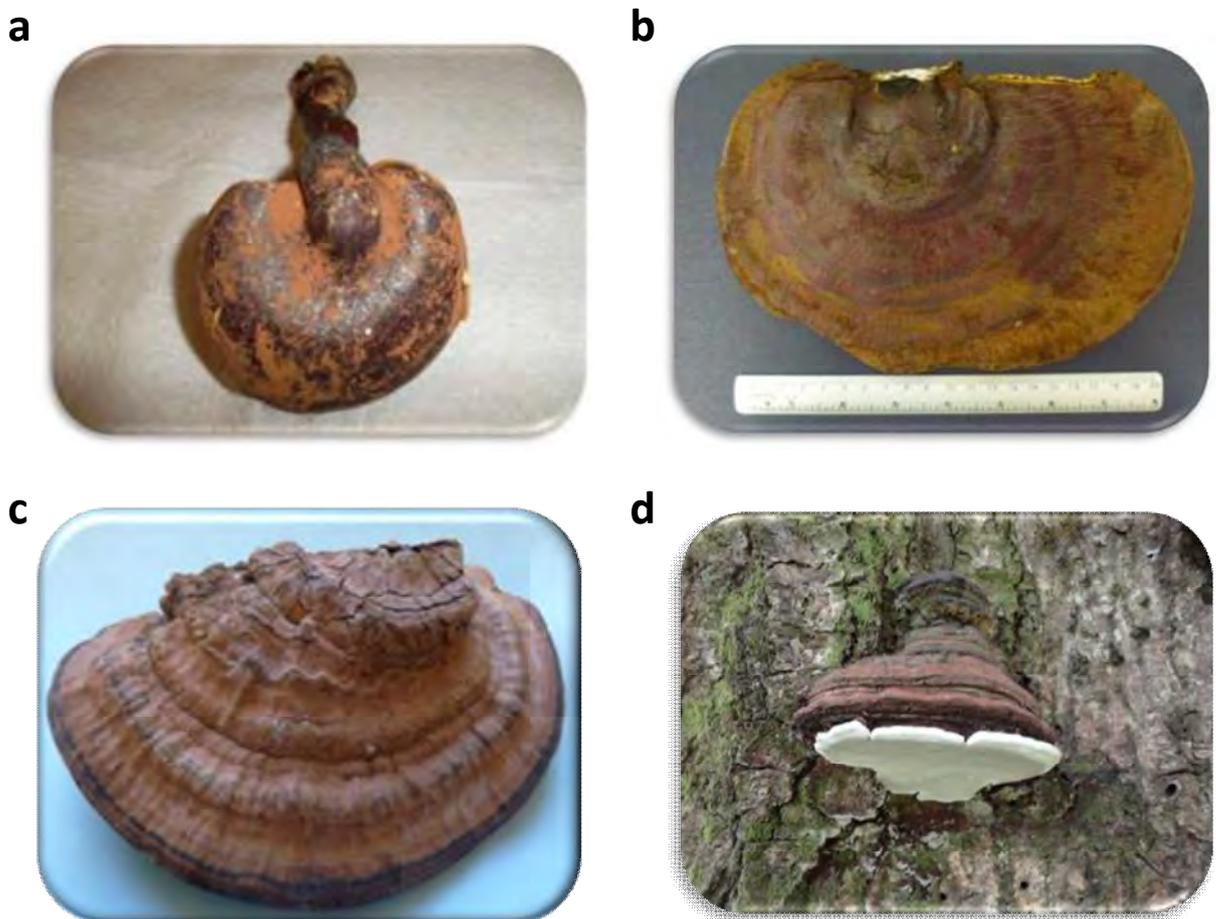


Figura 5. Basidiomas silvestres recolectados: a) *Ganoderma curtisii* (Bosque de *Fagus*, Zacualtipán de Ángeles); b) *G. curtisii* (Bosque de *Pinus-Quercus*, Acaxochitlán), c) *G. applanatum* (Bosque de *Pinus-Quercus*, Acaxochitlán), d) *G. brownii* (Bosque mesófilo de montaña, Tlanchinol).

Tabla 4. Listado de especies de *Ganoderma* spp. recolectadas. Se indica localidad, tipo de vegetación: BPQ (bosque de *Quercus-Pinus*), BMM (bosque mesófilo de montaña), BF (bosque de *Fagus*) y hospedero.

ESPECIE	LOCALIDAD	MUNICIPIO	VEGETACIÓN	HOSPEDERO
<i>G. applanatum</i>	Venta Quemada	Acaxochitlán	BQ	<i>Quercus sp.</i>
<i>G. brownii</i>	Rancho Cuatempa	Tlanchinol	BMM	<i>Quercus sp.</i>
<i>G. curtisii</i>	La Mojonera	Zacualtipán	BF	<i>Fagus grandidolia</i> <i>Var. mexicana</i>
<i>G. curtisii</i>	Los Reyes	Acaxochitlán	BQP	<i>Quercus sp.</i>
<i>G. curtisii</i>	Rancho Cuatempa	Tlanchinol	BMM	<i>Quercus sp.</i>

9.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS ESPECIES

Ganoderma curtisii (Berk) Murrill 1908.

Basidiomas de tamaño variable entre 60 y 260 mm de longitud por 45 a 195 de ancho y 27 mm de altura, con forma de repisa semicircular, dimidiado y concado, de consistencia corchosa, crece de manera solitaria o cespitosa y en ocasiones varios basidiomas se fusionan entre sí (Figura 5).

El píleo es glabro, laqueado, con superficie ligeramente rugosa y zonaciones concéntricas, el color varía de acuerdo a la etapa de maduración observándose tonos de café oscuro a rojizo (8F8, 9F8), café claro (7D6, 6D5) o violáceos (11F8, 11F7, 11E8, 11E4), se encuentran cubiertos por una capa de esporas color café claro (6D8) (Figura 7), el margen es entero y redondeado 3-4 mm, la cutícula es desprendible, tiene un aroma fuerte a madera vieja entre agrio y dulce, con un sabor que va de harinoso insípido a amargo.

El himenio es color blanco (4A1) a blanco amarillento (4A2), se oscurece al ser maltratado y al desecarse, tornándose color café anaranjado (6C8) o café oscuro (7E7, 7F8, 8F7), los poros son redondeados e isodiamétricos presentando 3 a 5 por mm (Figura 7), los tubos son de color café claro (6D4) con tonalidades cafés (6E6) formando una capa de 1 a 20 mm que va del margen al interior.

El estípite es lateral, corchoso, cilíndrico y firme, en ocasiones se angosta hacia la base, su longitud varía desde 40 a 175 mm de largo, la superficie es brillante y laqueada de color café oscuro a café rojizo (8F8, 9F8, 9F7, 9E8).

El contexto está formado por tres capas con coloraciones naranja grisáceo (5B3, 5B4), café claro (6D8) y café anaranjado (6C4, 6C8) de 3 a 20 mm de grosor, las capas se encuentran separadas por sutiles líneas laqueadas. Al adicionar KOH al 5% el contexto se oscurece ligeramente. (Figuras 6 y 7).

El sistema hifal es trimítico, está integrado por hifas generativas delgadas con septos y fíbulas, hifas esqueléticas hialinas de pared gruesa de 2.4 a 5 μm e hifas conectivas ramificadas con septos de 2.4-5 μm (Figura 7).

Las basidiosporas son café-amarillentas de forma elipsoidal con ápice truncado, poseen poro apical, doble pared gruesa, ornamentaciones bien definidas y columnelas interparietales, sus dimensiones son 10.6 μm de largo por 7.3 μm de ancho y un factor Q de 1.4 a 1.6. Presentan reacción inhamiloide (Figura 7).

El hábitat en el que se localizan en el estado de Hidalgo, son bosques templados de *Quercus*, *Pinus-Quercus*, *Pinus-Quercus-Abies*, bosque tropical perennifolio y bosque mesófilo de montaña, creciendo sobre madera muerta de angiospermas (*Quercus* y *Fagus*), ocasionalmente se ha encontrado parasitando árboles viejos y enfermos, causando pudrición blanca.

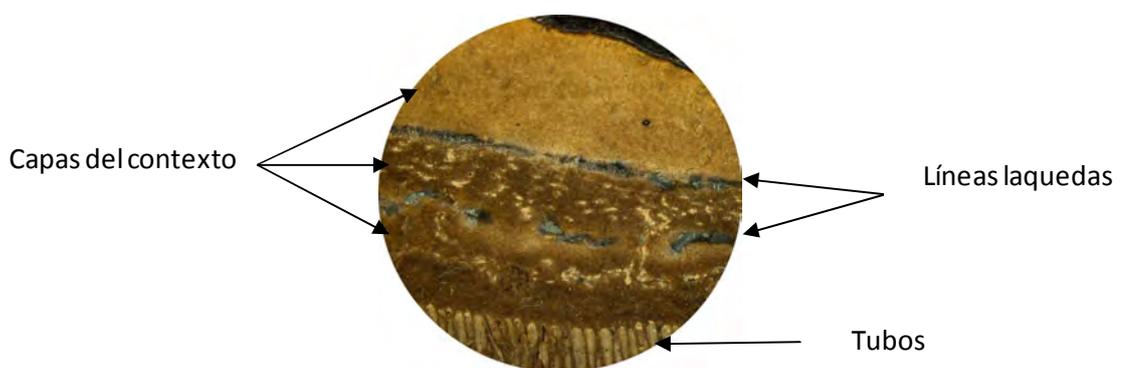


Figura 6. Corte longitudinal del basidioma de *G. curtisii*.

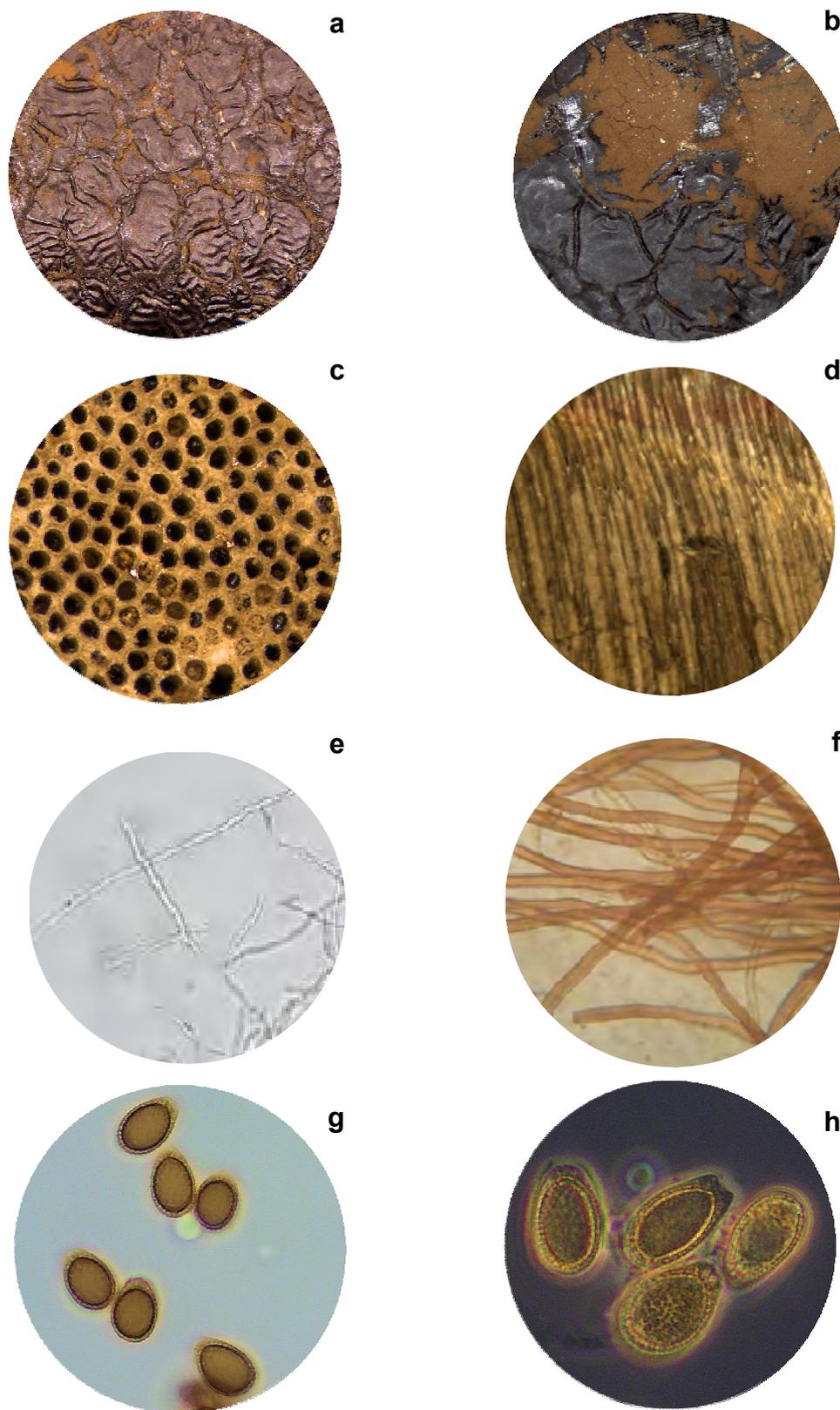


Figura 7. Micromorfología de *G. curtisii*: **a)** Cutícula laquada del píleo, **b)** Capa de esporas, **c)** Poros isodiamétricos del himenio, **d)** Tubos, **e)** Hifa conectiva septada, **f)** Hifas esqueléticas, **g)** Basidiosporas en campo claro, **h)** Basidiosporas en contraste de fases.

***Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1887**

Presenta basidiomas de tamaño variable, entre 120 y 400 mm de largo por 175 a 280 de ancho y de 7 a 10 mm de espesor, sésiles, de consistencia leñosa, que crecen solitarios o en pares, tienen forma de repisa semicircular y plana (Figura 5). El píleo es glabro, rugoso con surcos y zonaciones radiales a partir del margen, que presenta diferentes tonalidades, que van de café grisáceo (10F3, 9E3), rojo grisáceo (11D4) a café claro (7D5), la superficies es opaca, no laqueada y cubierta por una capa de esporas color café claro (7D7), el margen es continuo y redondeado de 4-9 mm (Figura 9). Tiene un aroma suave muy similar al chocolate y un sabor a madera ligeramente amargo.

El himenio es de color blanco (4A1) a blanco amarillento (4A2), con algunas áreas de color café claro (6D6, 6D5) al ser maltratado se vuelve café oscuro (7F8), se caracteriza por poros circulares isodiamétricos (3-5/mm) y tubos multicapa (12 a 31 mm) de color grisáceo rojizo (7B3) a café (7E6) (Figura 9).

El contexto es dúplex, mide 9 mm de grosor en el margen y se ensancha hacia el centro hasta los 22 mm, de color café oscuro (7F8) (Figura 8).

El sistema hifal es trimítico, con hifas generativas que presentan fíbulas, hifas esqueléticas de pared gruesa e hifas conectivas con ramificaciones, que miden de 2.44 a 4.8 μm (Figura 9).

Las basidiosporas son elongadas u oblongas, con el ápice truncado, con una pared gruesa doble, columnelas interparietales y ornamentaciones, de color café amarillentas, miden 9.5 μm de largo por 5.7 μm de ancho, el factor Q es de 1.7, y tienen reacción inhamiloide (Figura 9).

El hábitat de esta especie son los bosques de *Quercus* y *Quercus-Pinus*, siendo su hospedero *Quercus* spp.

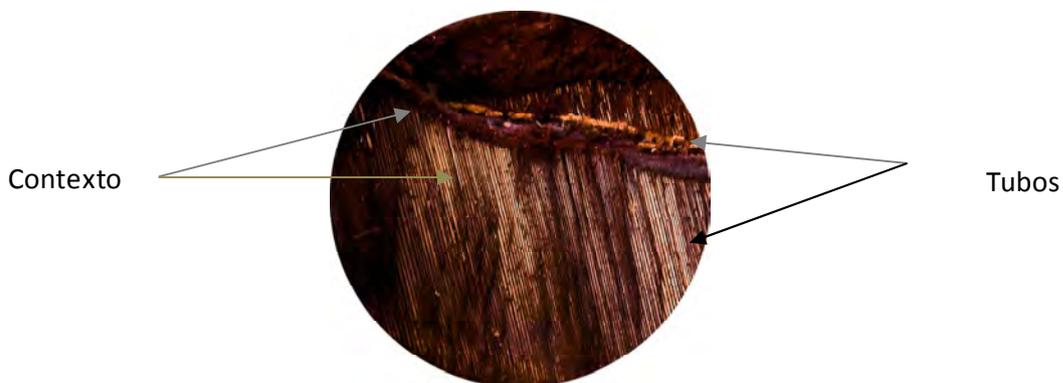


Figura 8. Corte longitudinal del basidioma de *G. applanatum*.

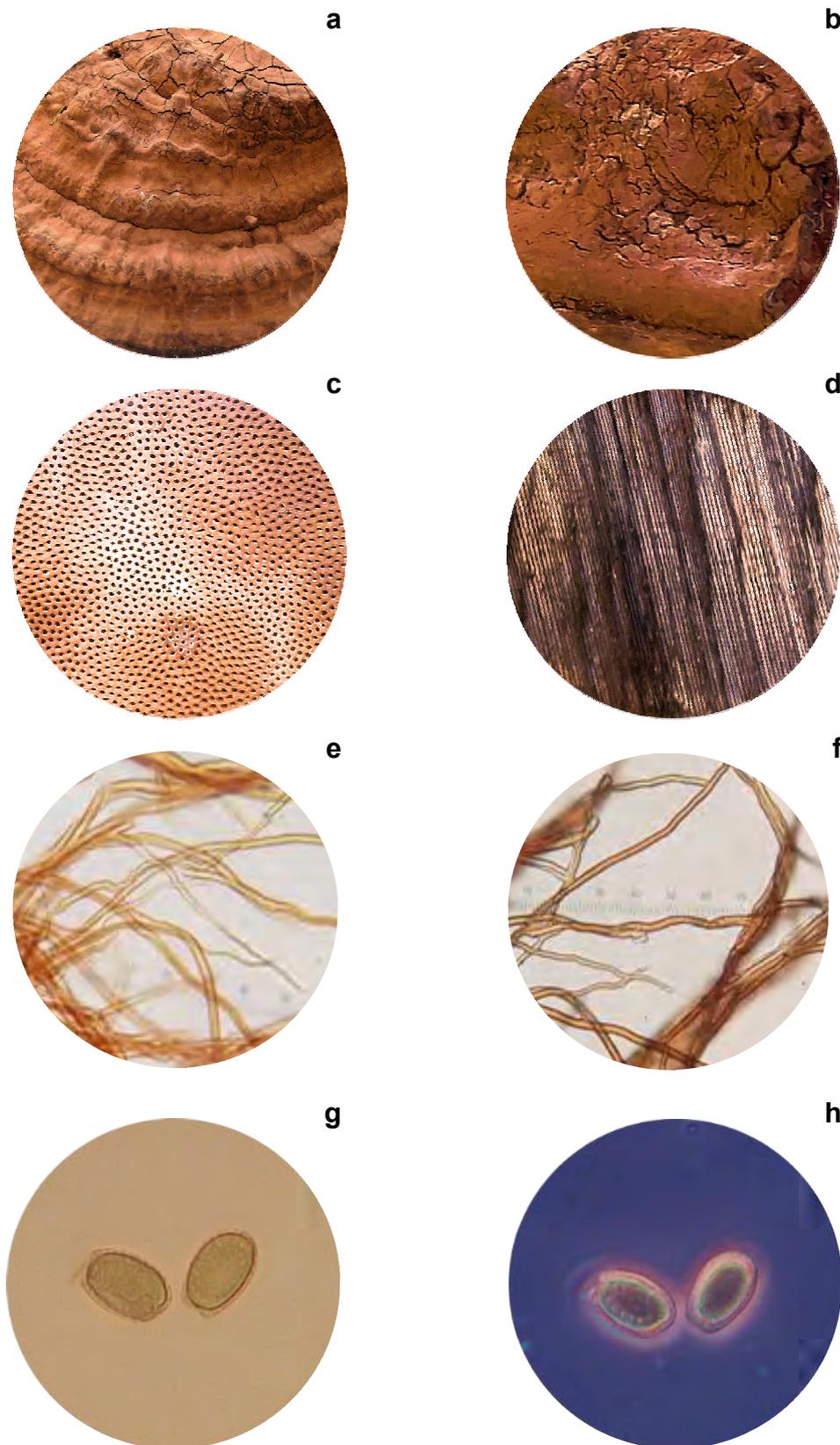


Figura 9. Micromorfología de *G. applanatum*: **a)** Zonaciones del píleo **b)** Capa de esporas en la superficie, **c)** Poros isodiamétricos del himenio, **d)** Tubos del himenio, **e)** Hifas conectivas, **f)** Hifas esqueléticas, **g)** Basidiosporas en campo claro, **h)** Basidiosporas en contraste de fases.

Ganoderma brownii (Murrill) Gilb.1962

Se caracteriza por desarrollar basidiomas sésiles, de consistencia leñosa y gran dureza, con forma de repisa semicircular y superficie rugosa que crecen de manera solitaria a lo largo del tronco, los ejemplares jóvenes son aplanados y al madurar se vuelven unglados, su tamaño varía de 62 a 120 mm de largo, 30 a 87 mm de ancho y 20-90 mm de espesor.

El píleo es opaco, no laqueado con diferentes tonalidades que van del café anaranjado (6C4, 6C5), café claro (7D8), café rojizo (8E6) al café oscuro (8F6, 8F8, 9F6), exhibiendo surcos y zonaciones radiales a partir del margen que es continuo y redondeado con un grosor de 2-4 mm, (Figura 10) Su aroma es suave a madera y su sabor harinoso. Al agregar KOH al 5% se oscurece el contexto y los tubos.

El himenio varía de blanco (4A1) a blanco amarillento (4A2), que tiende a oscurece al ser maltratado, tornándose de color café claro (6D6, 7D8) o café (6E4, 7E8), presenta poros circulares isodiamétricos (3-5/mm) y tubos multicapa (13 a 86 mm) (Figura 10).

El contexto está formado por 4 capas delgadas de color blanco (7A1), café claro (7D8) y café oscuro (7F8) de 3-4 mm de grosor (Figura 10).

El sistema hifal es trimítico, con hifas generativas, hifas esqueléticas de pared gruesa de 2.4-4.8 μm e hifas conectivas de 2.4 -4.8 μm (Figura 10).

Las basidiosporas son elongadas u oblongas, con ápice truncado y pared gruesa doble, color café amarillentas, miden en promedio 10.6 μm de largo por 5.9 μm de ancho con un factor Q de 1.8, (Figura 10).

Se encuentran en bosque mesófilo de montaña y bosque tropical caducifolio sobre madera muerta y ejemplares enfermos de *Quercus*, causando pudrición blanca.

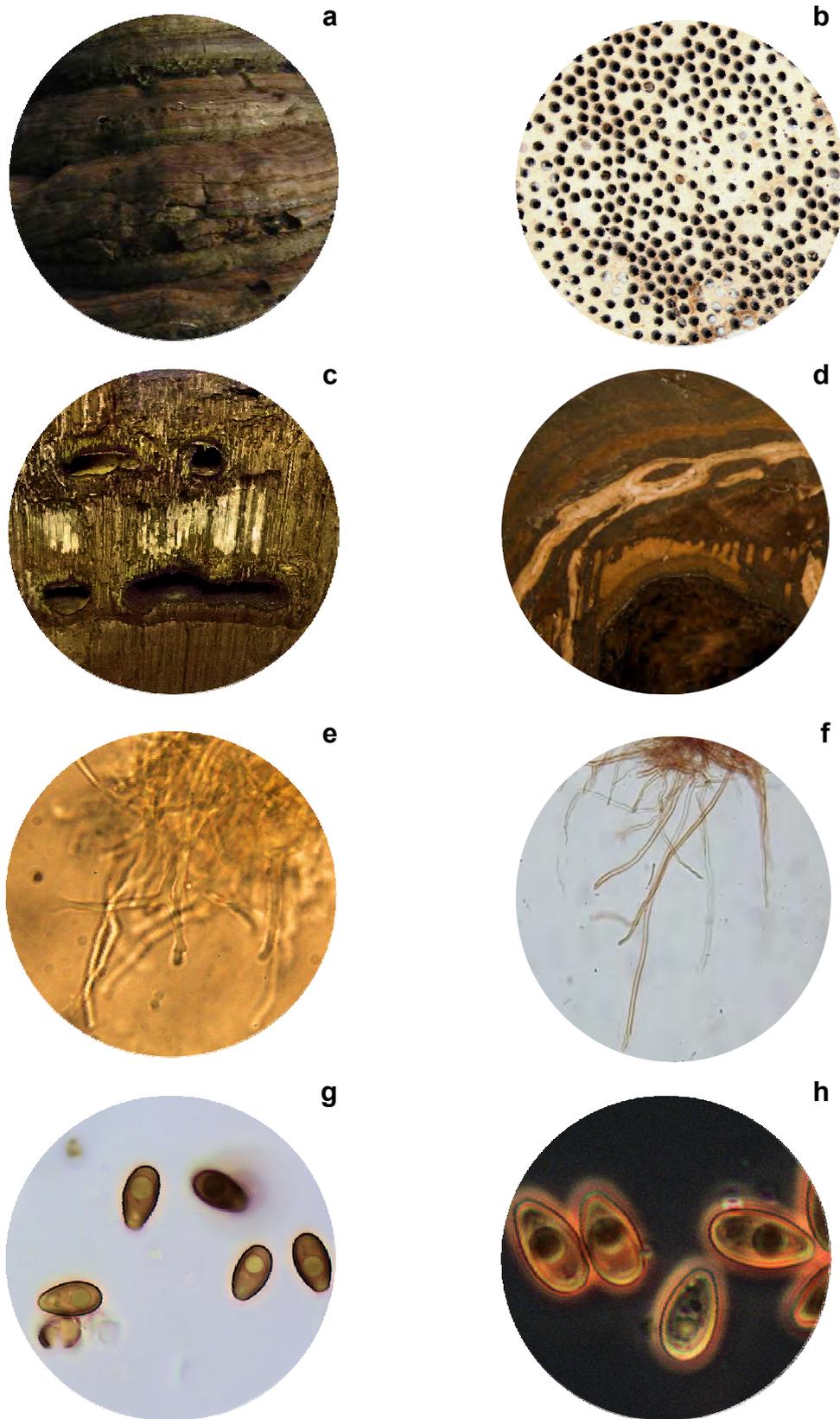


Figura 10. Morfología de *G. brownii*: **a)** Superficie del píleo, **b)** Poros isodiamétricos del himenio, **c)** Tubos multicapa. **d)** Contexto con 4 capas delgadas, **e)** Hifas conectivas, **f)** Hifas esqueléticas, **g)** Basidiosporas en campo claro, **h)** Basidiosporas en contraste de fases.

9.3 AISLAMIENTO DE CEPAS

A partir de los basidiomas recolectados se aislaron 4 cepas, que se incorporaron al cepario (Tabla2).

- *G. curtisii* (Acaxochitlán) **UAEH-017**
- *G. curtisii* (Zacualtipán) **UAEH-018**
- *G. applanatum* (Acaxochitlán) **UAEH-030**
- *G. brownii* (Tlanchinol) **UAEH-026**

9.4 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO Y EN SUSTRATO

La propagación de las cepas UAEH-017, UAEH-018 UAEH-026 y UAEH-030 para la producción de micelio se realizó en cinco lotes de 100 frascos con medio líquido (MYP) por cepa (Figura 11). Las cepas UAEH-017 y UAEH-030 fueron transferidas para su cultivo a bolsas con 500g de sustrato (aserrín de encino suplementado), obteniendo fructificaciones después de tres meses de incubación (Figura 12).



Figura 11. Micelio cultivado en medio líquido MYP (malta-peptona-levadura).



Figura 12. Cultivo de la cepa UAEH-017 (*G. curtisii*) en sustrato. Se observan los primordios y basidiomas.

9.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EN *G. curtisii*

Se estimó el rendimiento de los extractos de *G. curtisii* (GcA-b) obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol (Tabla 5). El análisis por RMN de ^1H , mostró en el extracto hexánico la presencia de esteroides y ácidos grasos, en el extracto de acetato de etilo se observó una composición similar con mayor proporción de ácidos grasos, y en el extracto metanólico una mezcla de polisacáridos, por lo que se decidió continuar la separación de los extractos hexánicos (Figura 13).

Tabla 5. Extractos obtenidos de basidiomas silvestres de *G. curtisii* (GcA-b)

Basidioma (500 mg)	Extracto	Peso (g)
Muestra 1	Hexano	0.6474
	AcOEt	1.5617
	Metanol	2.1173
Muestra 2	Hexano	0.5052
	AcOEt	1.5233
	MeOH	2.0507

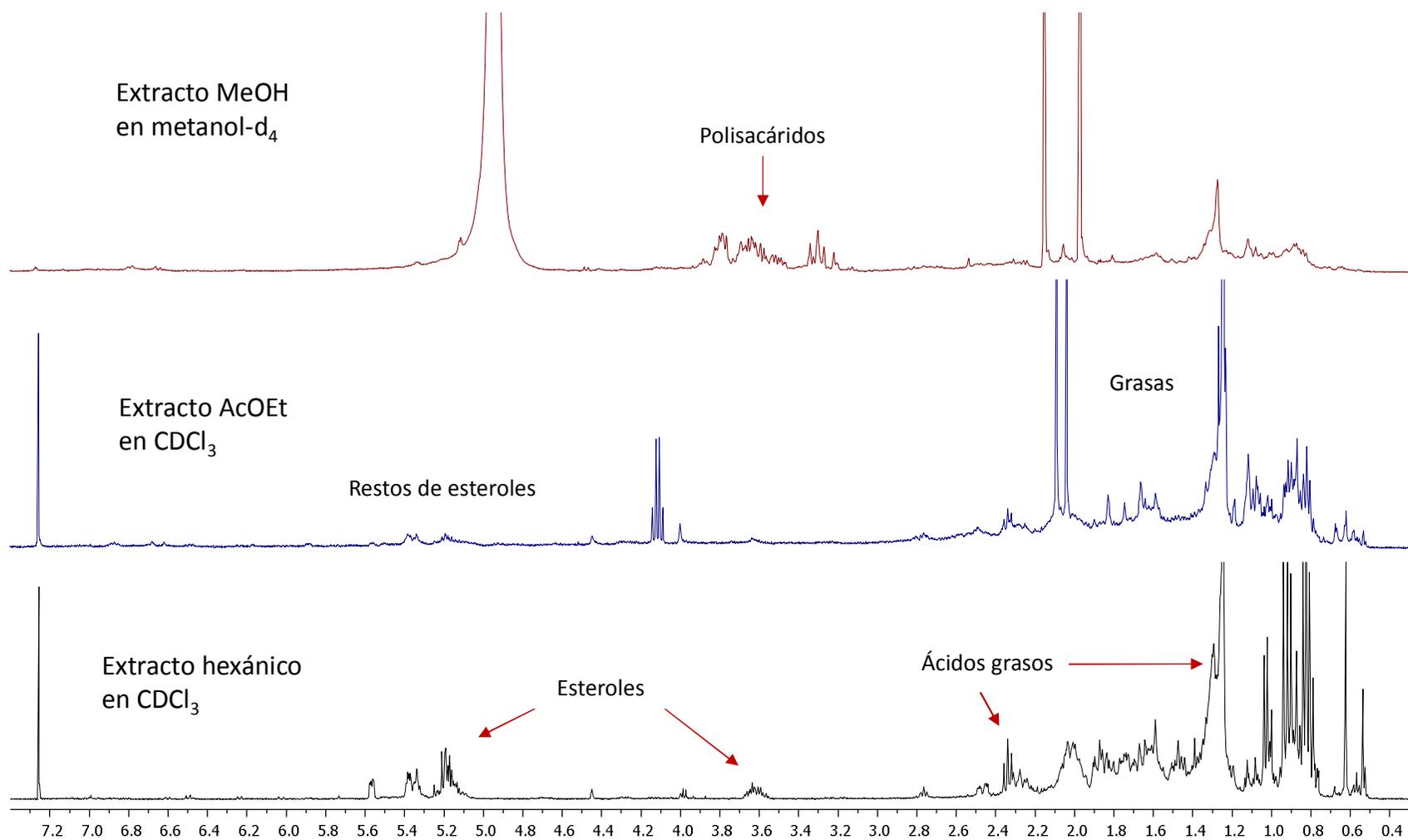


Figura 13. Espectros de RMN ^1H (400MHz) de los extractos de *G. curtisii* (GcA-b)

Durante la concentración del extracto hexánico se observó la formación de un precipitado cristalino que se separó del sobrenadante por decantación, obteniendo 6.5 mg de muestra, cuyo análisis por RMN de ^1H determinó que estaba formado por dos compuestos esteroideos: ergosterol (**1**) y estelasterol (**2**), en una proporción relativa 85:15.

El sobrenadante decantado se separó mediante CC utilizando hexano-AcOEt (4:1), obteniendo 14 eluatos de 50 mL, que se analizaron por CCF para observar la distribución de los compuestos (Figura 14, tabla 6).

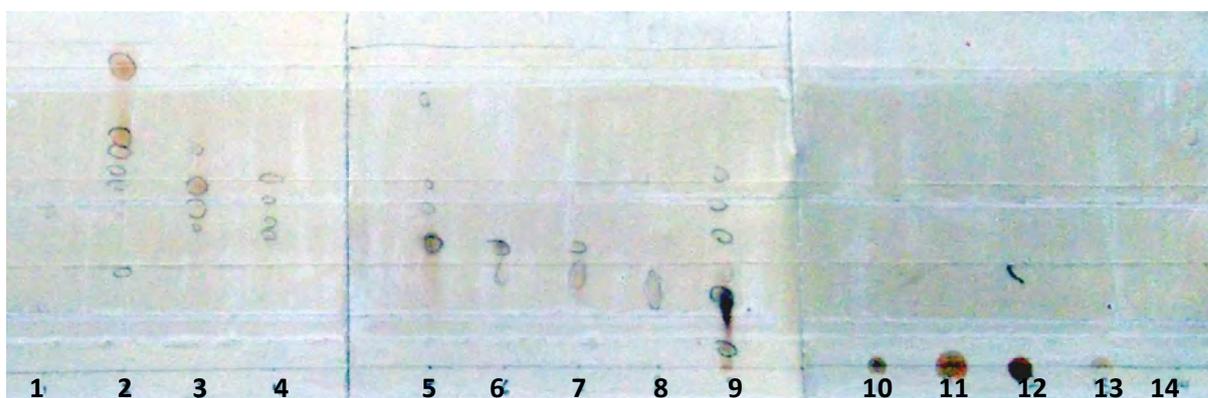


Figura 14. CCF de la primera separación de eluatos del extracto hexánico de *G. curtisii*.

Tabla 6. Fracciones obtenidas en la primera separación del extracto hexánico de *G. curtisii* por cromatografía flash (CC).

Fracción	Grupo	Eluyente	Peso gr
1	A	hexano-AcOEt 4:1	0.0005
2	A	hexano-AcOEt 4:1	0.1156
3	A	hexano-AcOEt 4:1	0.0508
4	A	hexano-AcOEt 4:1	0.0543
5	A	hexano-AcOEt 4:1	0.0599
6	A	hexano-AcOEt 4:1	0.0372
7	A	hexano-AcOEt 4:1	0.0188
8	A	hexano-AcOEt 1:1	0.0143
9	B	hexano-AcOEt 1:1	0.3136
10	C	hexano-AcOEt 1:1	0.0346
11	C	metanol	0.0229
12	C	metanol	0.0474
13	D	metanol	0.0695
14	D	metanol	0.0001

Las fracciones 5, 8 y 9 se analizaron mediante RMN de ^1H , observando en la fracción 9 la presencia de triterpenos (Figura 17), se continuó la separación de esta fracción (313 mg) por CC con hexano-AcOEt (4:1 y 1:1) recuperando 34 fracciones de 20 mL (Figura 15). En las fracciones 32 y 33 eluidas con hexano-AcOEt (1:1) se obtuvo una mezcla de ergosterol (**1**) y estelasterol (**2**), mientras que en la fracción 34 se obtuvo el compuesto **1**. Después realizar CC a la fracción 33 con hexano-AcOEt (7:3), se recuperaron 26 fracciones de 20 mL, al realizar CCF se encontraron los compuestos mayoritarios entre las fracciones 6 y 11 (Figura 16). La fracción 7 se sometió a RMN de ^1H mostrando los compuestos **1** y **2**, se asignaron las señales principales al compuesto **1** (Figura 18) y se comparó su espectro con el de ergosterol marca Aldrich (Figura 19).

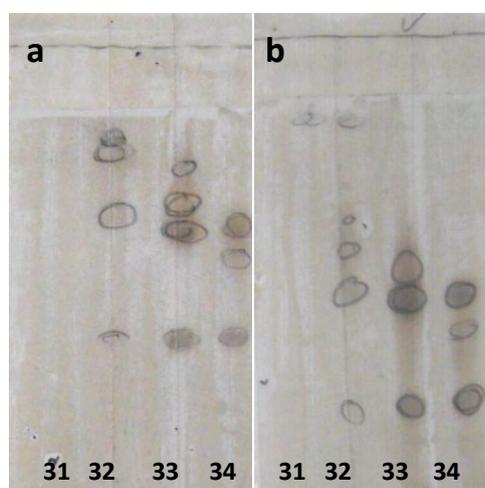


Figura 15. Cromatografía en capa fina de las fracciones 9-31, 9-32, 9-33 y 9-34 en: a) hexano-AcOEt 6:4 y b) hexano-AcOEt 7:3.

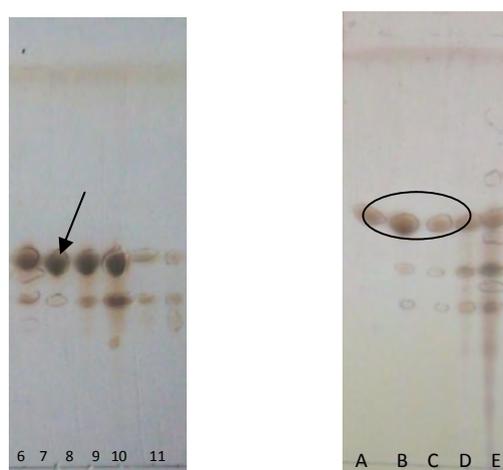


Figura 16. a) Cromatografía TLC de la fracción 9-33 en hexano-AcOEt 7:3 y b) Cromatografía de la fracción 9-33-7 Hexano-AcOEt 4:1

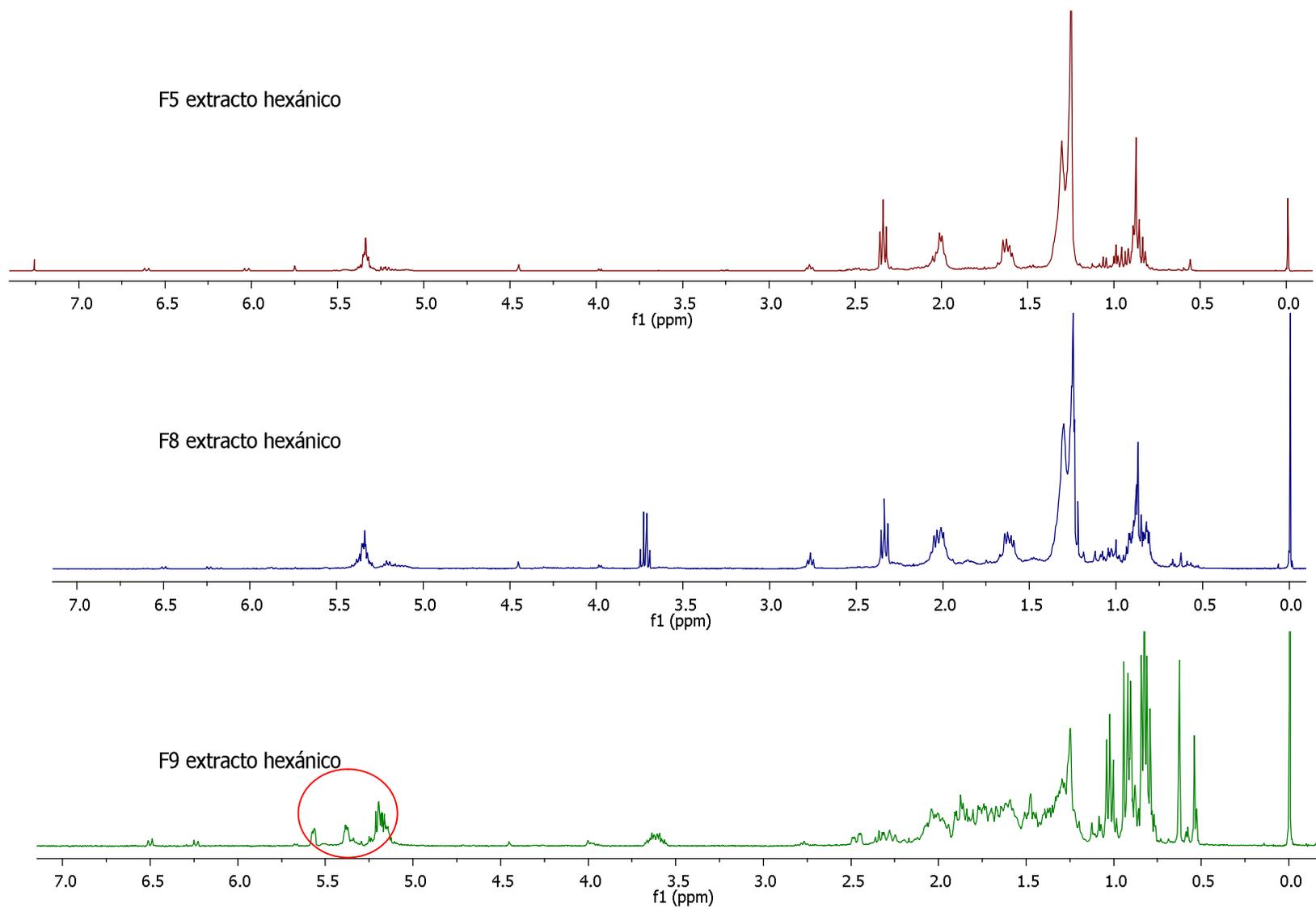


Figura 17. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de las fracciones 5, 8 y 9 del extracto hexánico.

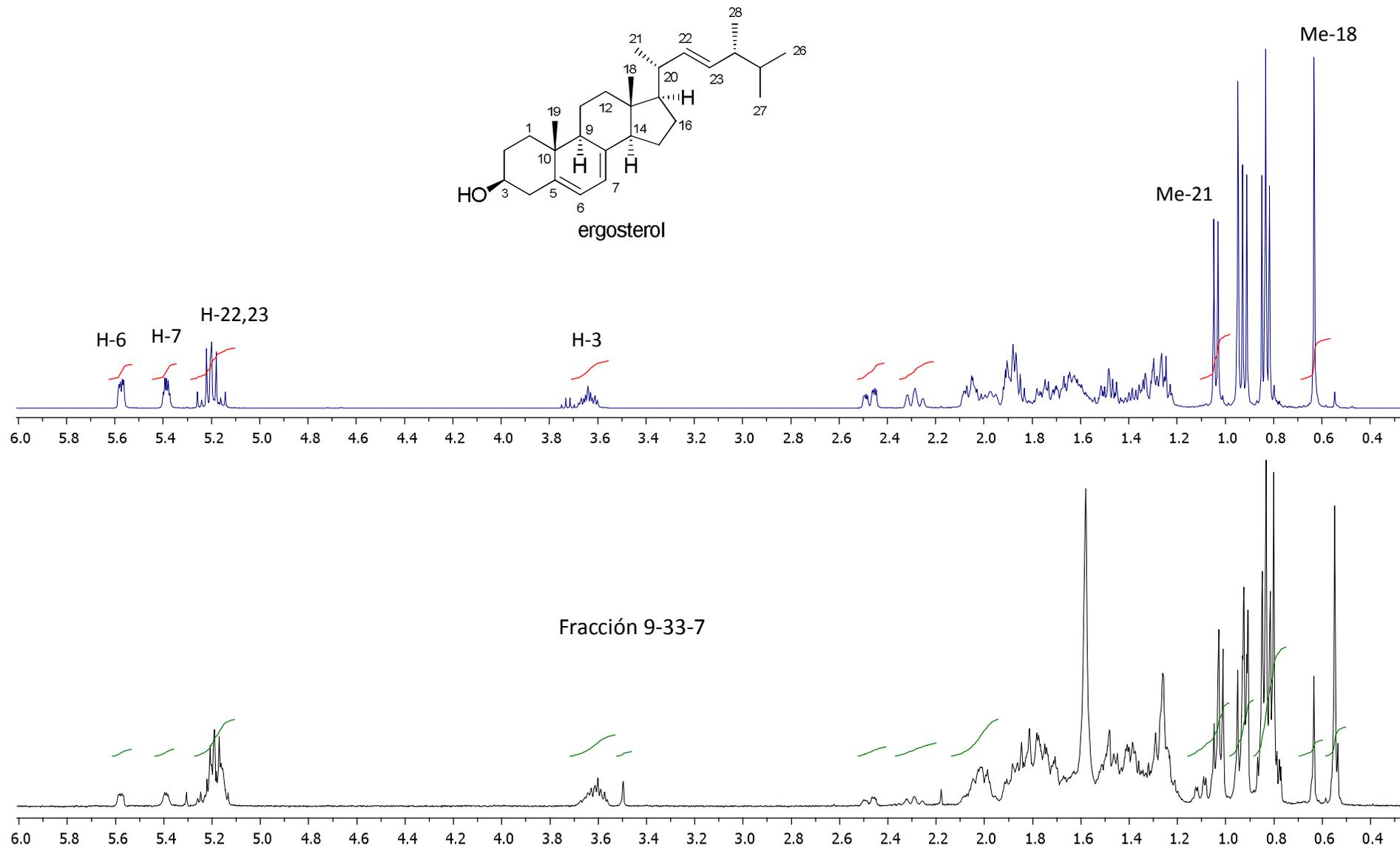


Figura 18. Comparación de espectros de RMN de ¹H (400 MHz) en CDCl₃ del ergosterol comercial (arriba) y fracción 9-33-7 (abajo).

Para aislar el compuesto **2**, la fracción 9-33-7 se re-cristalizó con $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ obteniendo 5 fracciones (A, B, C, D y E) que fueron examinadas por CCF y se seleccionaron las fracciones B, C y E para RMN de ^1H (Figura 20). La fracción E contenía restos de un esteroide y grasas, mientras que las fracciones B y C los compuestos **1** y **2**, éstas dos fracciones se reunieron y analizaron mediante RMN ^1H y C_{13} , con lo que se elucidó el estelasterol (**2**) o ergosta-7,22-dien-3-ol (16.4 mg) con fórmula $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$ y se asignaron sus señales características (Figura 21). En la figura 19 se muestra la estructura molecular de los compuestos **1** y **2**. Adicionalmente se cotejaron los desplazamientos reportados para ergosterol y estelasterol (Tablas 7 y 8).

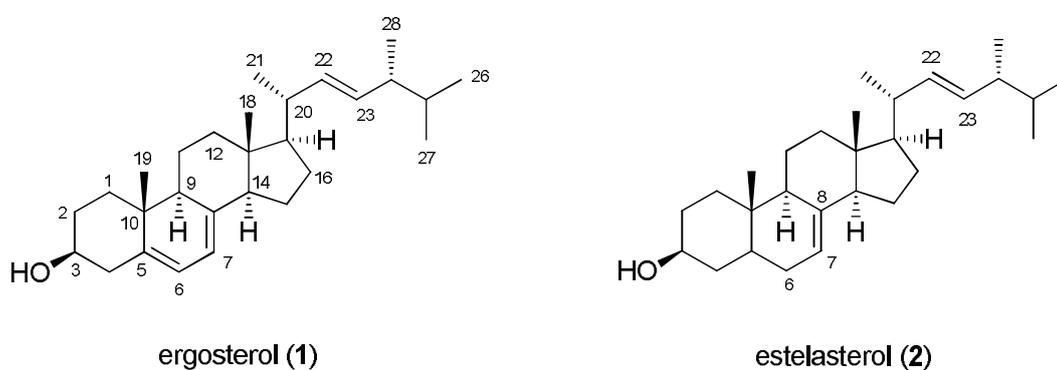


Figura 19. Estructura química de ergosterol (1) y estelasterol (2).

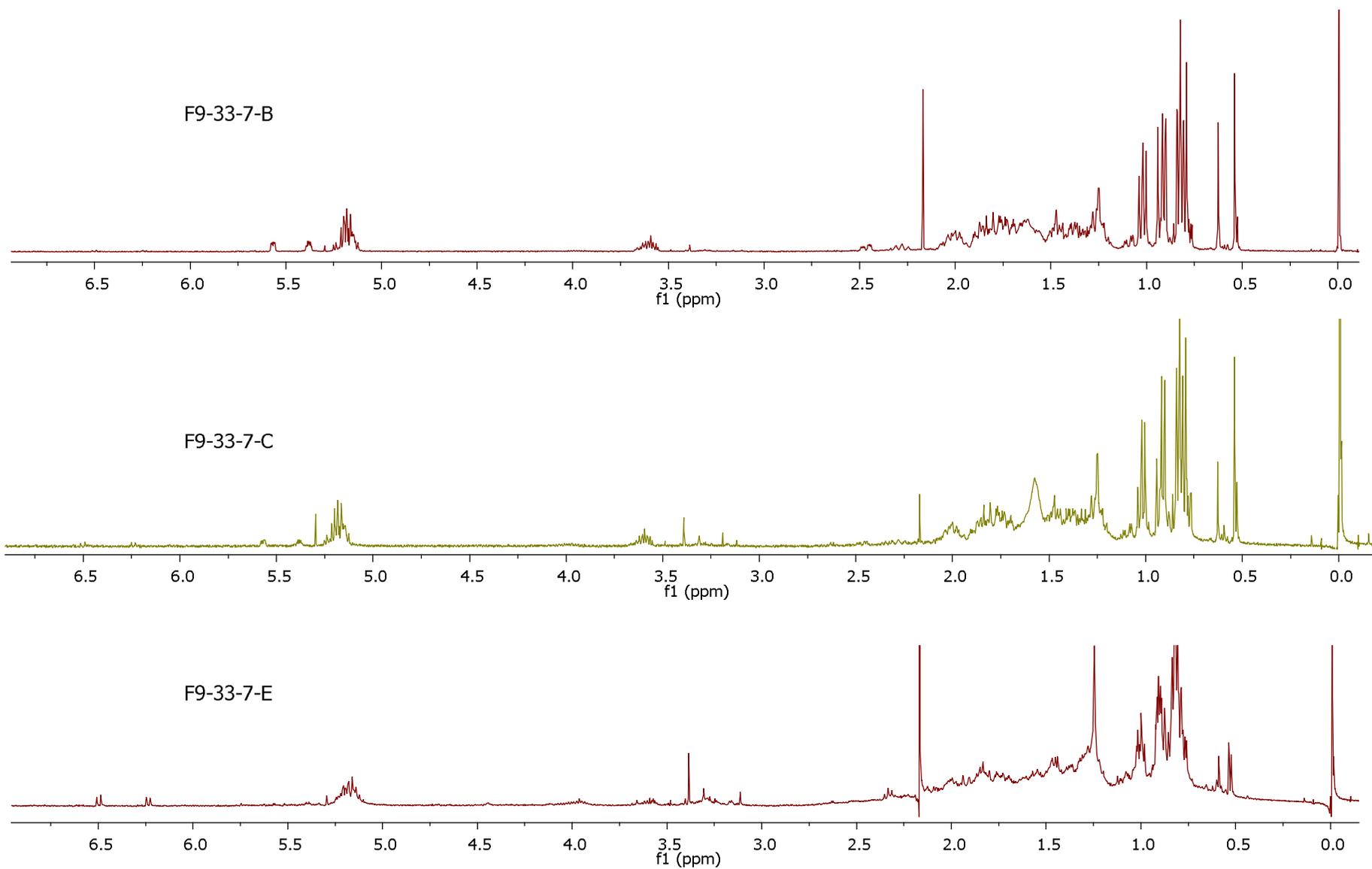


Figura 20. Espectros de RMN ^1H (400MHz) en CDCl_3 de fracciones 9-33-7, B, C y E.

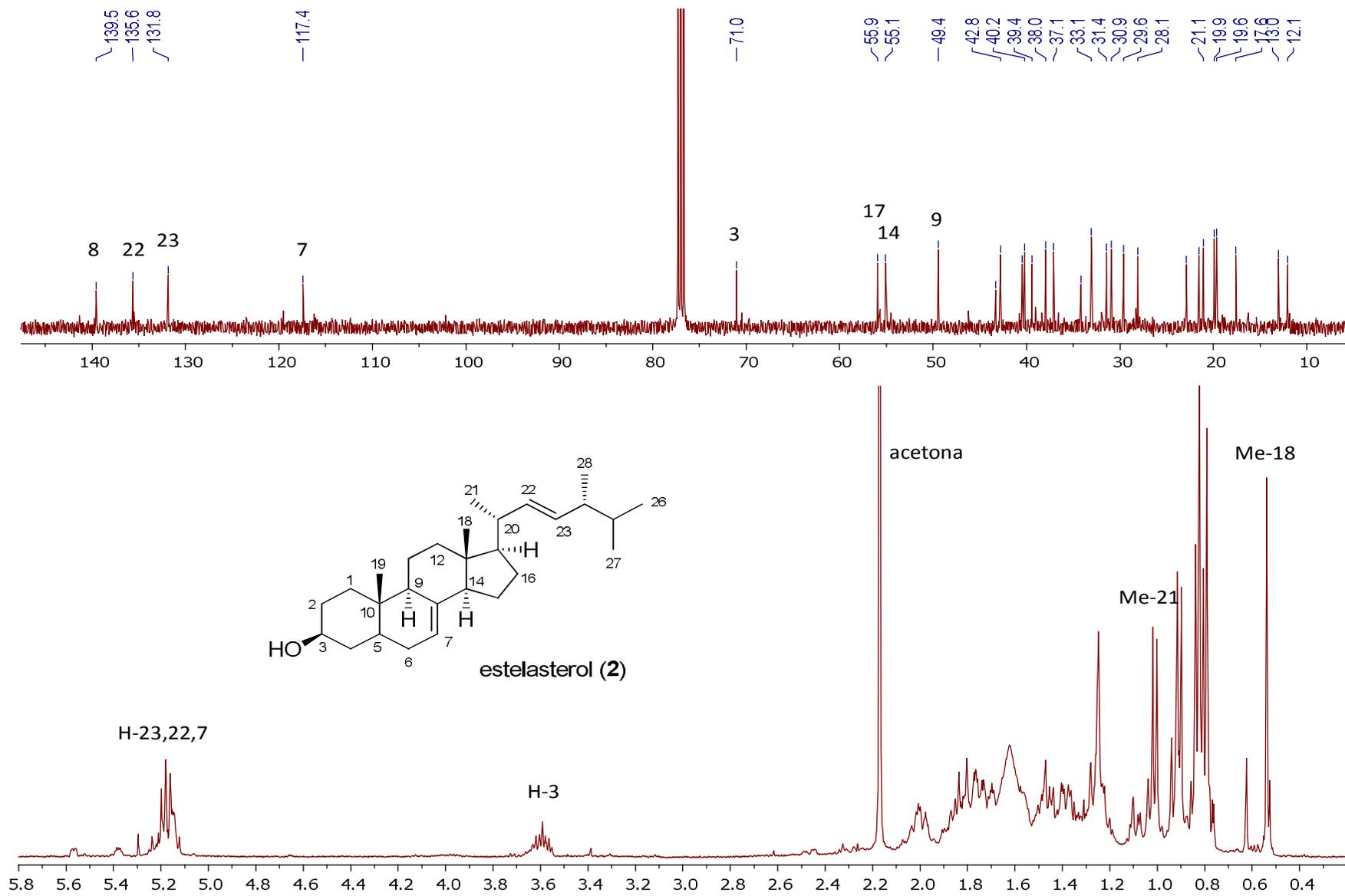


Figura 21. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 del estelasterol (2) (F 9-33 7 BC).

Tabla 7. Comparación de desplazamientos en RMN ¹H de ergosterol

Protón	δH (J Hz)		
	ergosterol F-9-33-7	Seo <i>et al.</i> , 2015 (400 MHz)	Borlagdan <i>et al.</i> , 2017 (400 MHz)
H6	5.57 ($J = 5.6, 2.4$ Hz)(dd)	5.55 ($J = 2.8, 5.4$ Hz)(dd)	5.57 ($J = 2.8, 5.6$ Hz)(dd)
H7	5.38 ($J = 5.6, 2.7$ Hz)(dt)	5.36 ($J = 2.8$ Hz)(q)	5.38 ($J = 2.8, 5.6$ Hz)(dd)
H 23	5.23 ($J = 15.3, 7.1$ Hz)(dd)	5.15 (m)	5.15 (m)
H 22	5.17 ($J = 15.3, 7.6$ Hz)(dd)	5.19 (m)	5.22(m)
H3 α	3.64 ($J = 11.3, 4.1$ Hz)(tt)		3.63 (m)
H4 α	2.46 ($J = 14.3, 4.7, 2.2$ Hz)(ddd)		
H4 β	2.27 ($J = 12.9$ Hz)(ddd)		
Me 21	1.03 ($J = 6.6$ Hz)(d)	1.02 ($J = 6.8$ Hz)(d)	1.01 ($J = 8.4$ Hz)(d)
M 19	0.94 (s)	0.93 (s)	0.93 (s)
Me 28	0.91 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.90 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.91 ($J = 6.0$ Hz)(d)
Me 26	0.83 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.79 ($J = 7.6$)(d)	0.85 ($J = 6$ Hz)(d)
Me 27	0.81 ($J = 6.1$ Hz)(d)	0.82 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.82 ($J = 6$ Hz) (d)
M 18	0.62 (s)	0.61 (s)	0.61 (s)

J =Constante de acoplamiento (Hz)

Multiplicidad de la señal= d (doble), dd (doble de doble), dt (doble de triple), m (múltiple), s (simple)

Tabla 8. Comparación de desplazamientos en RMN ¹H de estelasterol

Protón	δH (J Hz)		
	Estelasterol obtenido	Seo <i>et al.</i> , 2015 (400 MHz)	Leliebre-Lara <i>et al.</i> , 2016 (400 MHz)
H7	5.29 (s)	5.14 (m)	5.19 ($J = 6.9$ Hz)(t)
H22	5.20 ($J = 7.2$ Hz)(d)	5.14 (m)	5.15 (m)
H23	5.15 ($J = 7.6$ Hz)(d)	5.17(m)	5.15 (m)
H3	3.59 ($J = 11.1, 4.6$ Hz)(tt)	3.57 (m)	3.6 (m)
Me 21	1.00 ($J = 6.5$ Hz)(d)	1.00 ($J = 6.4$ Hz)(d)	1.07 ($J = 6.6$ Hz)(d)
Me 28	0.90 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.89 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.92 ($J = 7.0$ Hz)(d)
Me 26	0.82 ($J = 6.2$ Hz)(d)	0.81 ($J = 13.2$ Hz)(d)	0.82 ($J = 6.6$ Hz)(d)
Me 27	0.81 ($J = 6.6$ Hz)(d)	0.81 (s)	0.84 ($J = 6.6$ Hz)(d)
Me 19	0.79 (s)	0.78 (s)	0.89 (s)
Me 18	0.53 (s)	0.52 (s)	0.82 (s)

δ =desplazamiento químico de la señal (ppm)

J = Constante de acoplamiento (Hz)

Multiplicidad de la señal= d (doble), dd (doble de doble), m (múltiple), s (simple)

Por otra parte, las fracciones 10, 11, 12 y 13 de la primera separación, se purificaron por TLC con cloroformo-AcOEt (4:1) (Figura 22). En la fracción 12 se observó un compuesto aparentemente puro (47.4 mg), por lo que se analizó mediante RMN de ^{13}C y ^1H determinándose de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas que se trata del peróxido de ergosterilo (**3**) o 5 α ,8 α -epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol, con fórmula $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ (Figuras 23 y 24). Así mismo, se confrontaron los datos de los desplazamientos químicos del compuesto aislado con los publicados para el peróxido de ergosterol (Tabla 9).

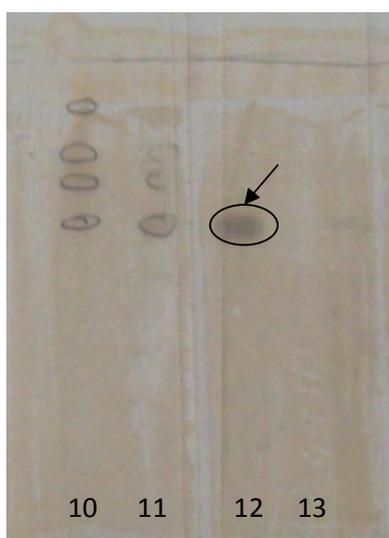
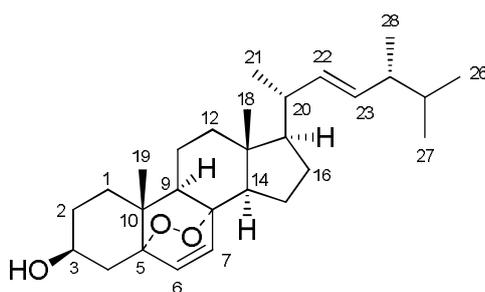
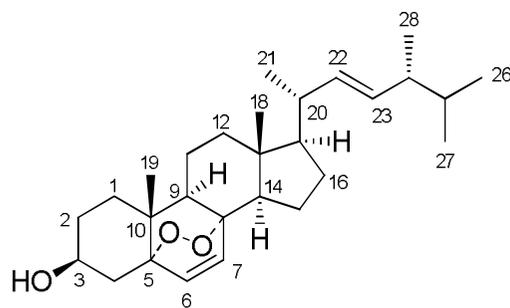
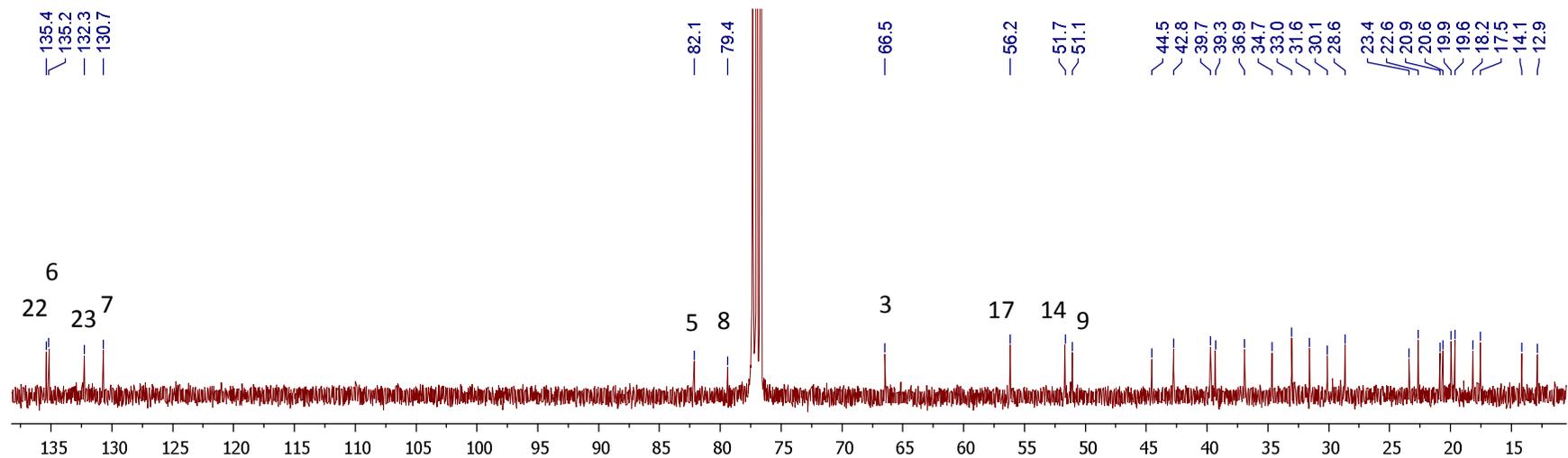


Figura 22. TLC de las fracciones 10, 11 y 12 en cloroformo-AcOEt 4:1.



peróxido de ergosterilo (**3**)

Figura 23. Estructura química del peróxido de ergosterilo (5 α ,8 α -epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol).



peróxido de ergosterilo (3)

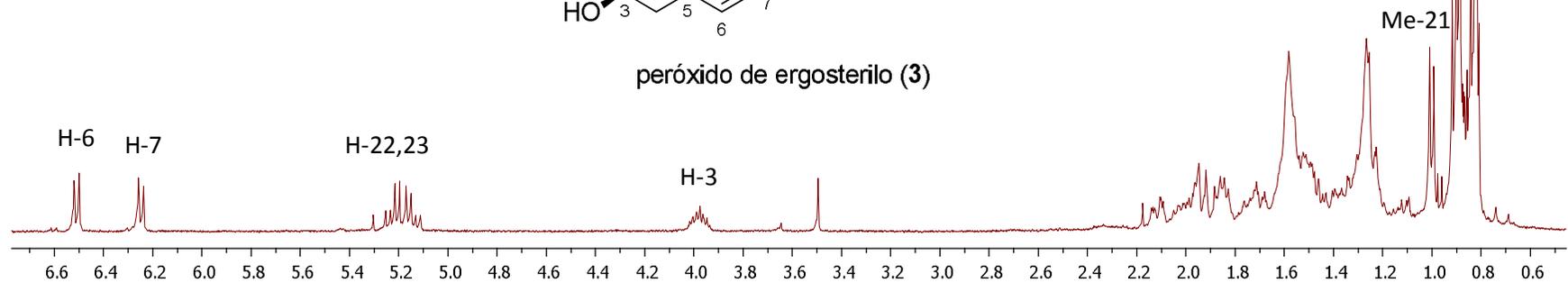


Figura 24. Espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz) y ^1H (400 MHz) en CDCl_3 del peróxido de ergosterilo (3) (fracción 12).

Tabla 9. Comparación de desplazamientos en RMN ¹H del peróxido de ergosterilo.

Protón	δH (J Hz)		
	F12 (400 MHz)	Seo <i>et al.</i> , 2015 (400 MHz)	Leliebre-Lara <i>et al.</i> , 2016 (400 MHz)
H6	6.5085 ($J = 8.6$ Hz) (d)	6.24 ($J = 8.4$ Hz) (d)	6.26 ($J = 8.4$ Hz)(d)
H7	6.24735 ($J = 8.4$ Hz) (d)	6.50 ($J = 8.4$ Hz)(d)	6.55 ($J = 8.4$ Hz)(D)
H22	5.22435 ($J = 7.4$ Hz)(dd)	5.14 ($J = 8.0, 15.2$ Hz)(dd)	5.20 ($J = 7.8, 15.0$ Hz)(dd)
H23	5.14055 ($J = 7.9$ Hz)(dd)	5.23 ($J = 7.6, 15.2$ Hz)(dd)	5.15 ($J = 8.4, 15$ Hz)(dd)
H3	3.9745 ($J = 5.2, 11.4$ Hz) (tt)	3.97 (m)	3.97 (m)
Me 21	0.99975 ($J = 6.6$ Hz)(d)	1.00 ($J = 6.4$ Hz)(d)	1.05 ($J = 6.6$ Hz)(d)
Me 28	0.90855 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.91 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.92 ($J = 7.0$ Hz)(d)
Me 19	0.8849 (s)	0.89 (s)	0.89 (s)
Me 26	0.83815 ($J = 2.6$ Hz)(d)	0.84 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.82 ($J = 6.6$ Hz)(d)
Me 27	0.8211 ($J = 2.9$ Hz)(d)	0.82 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.84 ($J = 6.6$ Hz)(d)
Me 18	0.8082(s)	0.83 (s)	0.82 (s)

δ =desplazamiento químico de la señal (ppm)

J =Constante de acoplamiento (Hz)

Multiplicidad de la señal= d (doble), dd (doble de doble), m (múltiple), s (simple), t (triple), tt (triple de triple)

9.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EN *G. applanatum*

El extracto hexánico de *G. applanatum* (GaA-b) mostró un precipitado (130 mg) que fue lavado con hexano y recristalizado, se realizó CCF con hexano-AcOEt (9:1, 4:1, 7:3), teniendo una mejor la separación la mezcla 7:3 (Figura 25). Esta fracción del precipitado (Fpp) se sometió a RMN de ¹H mostrando en su composición los esteroides **1** y **2**, siendo más abundante **1** en una proporción 70:30 (Figura 26).

El resto del precipitado sin purificar (figura 26:1 y 2), se separó por CC con hexano-AcOEt 4:1, hexano-AcOEt 1:1 y metanol obteniéndose 24 fracciones, que se cromatografiaron en CCF con hexano-AcOEt 8:2 (Figura 27).

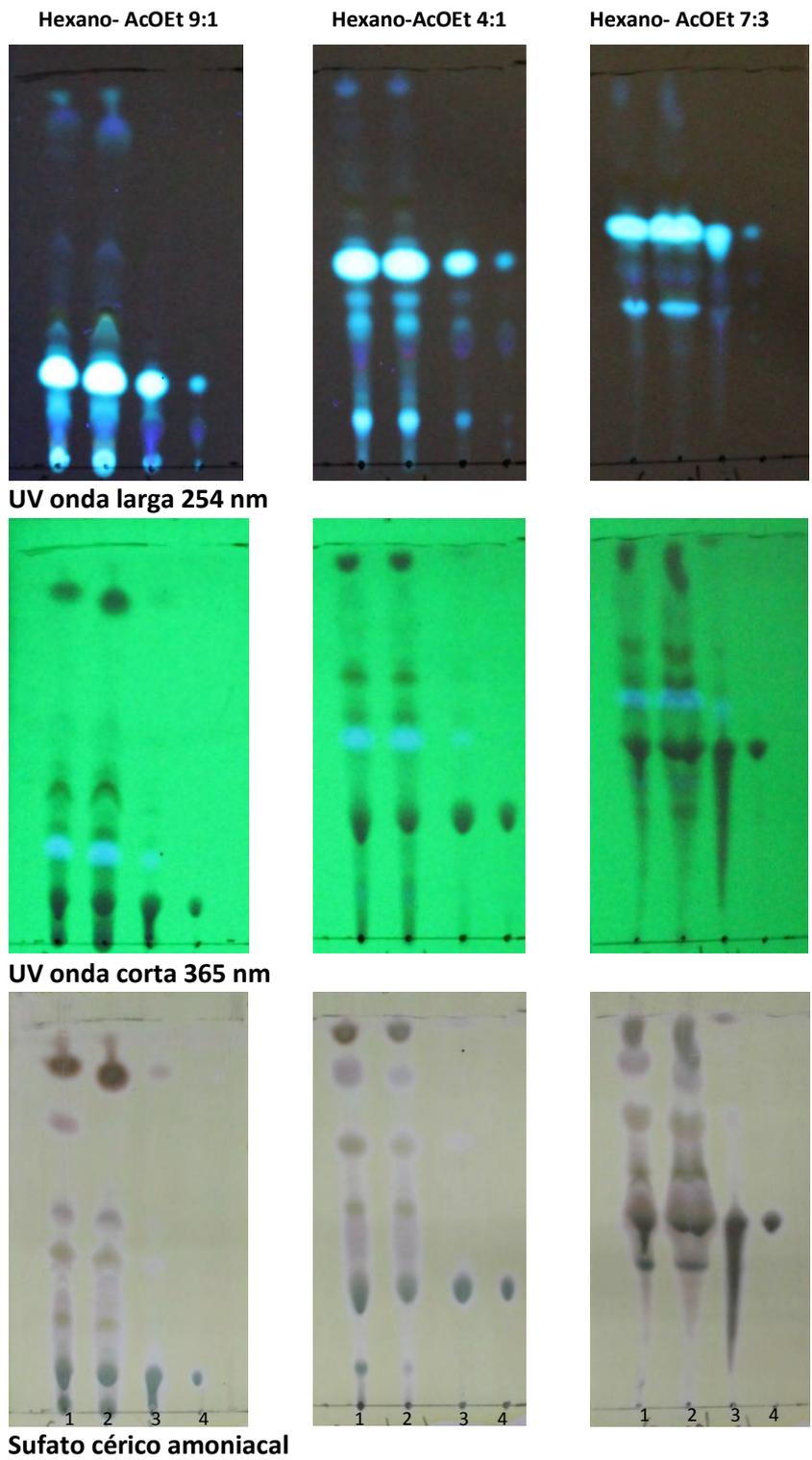


Figura 25. Preparación TLC del precipitado de *G. applanatum* (*Fpp*): sin purificar (1 y 2), lavado con hexano (3 y 4).

F pp *G. applanatum*

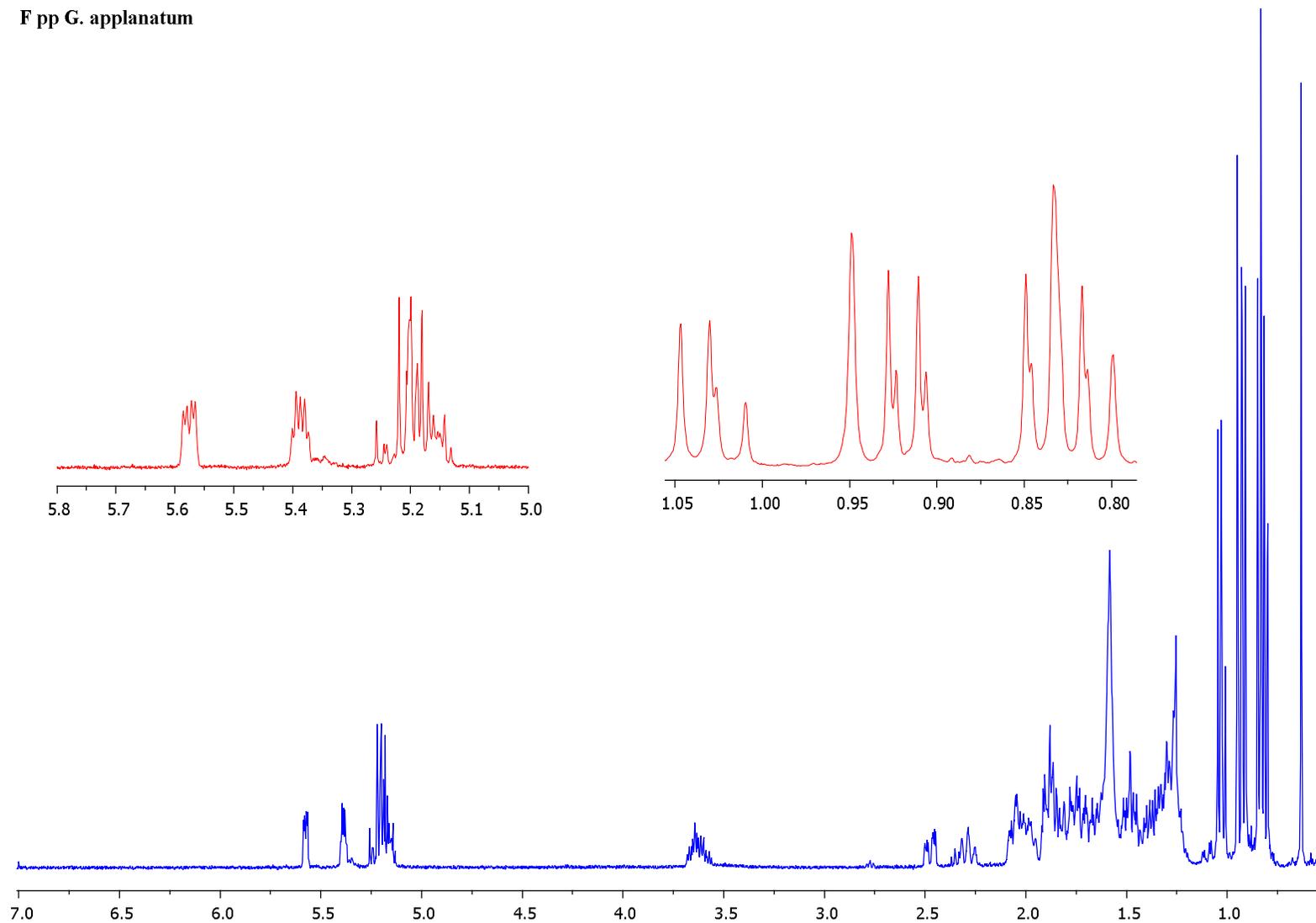


Figura 26. RMN ¹H (400MHz) en CDCl₃ del precipitado (Fpp) de *G. applanatum*, compuesto por los esteroides **1** y **2**.

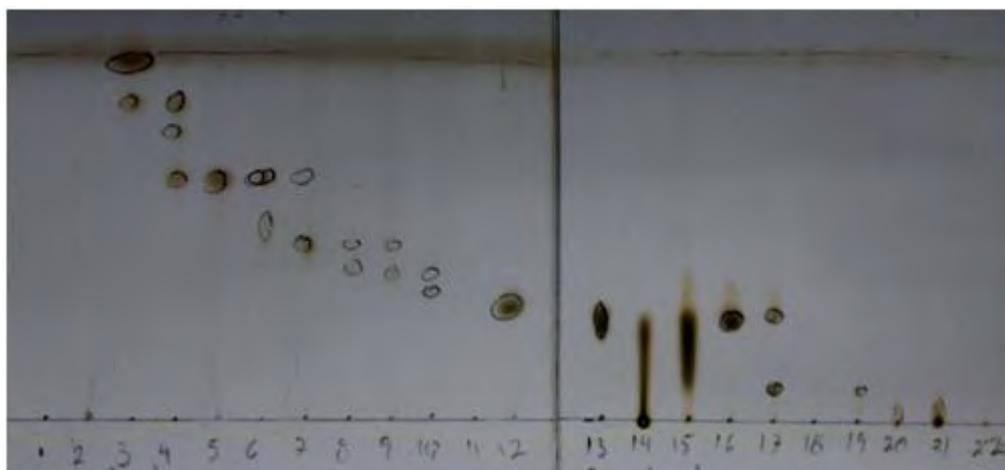
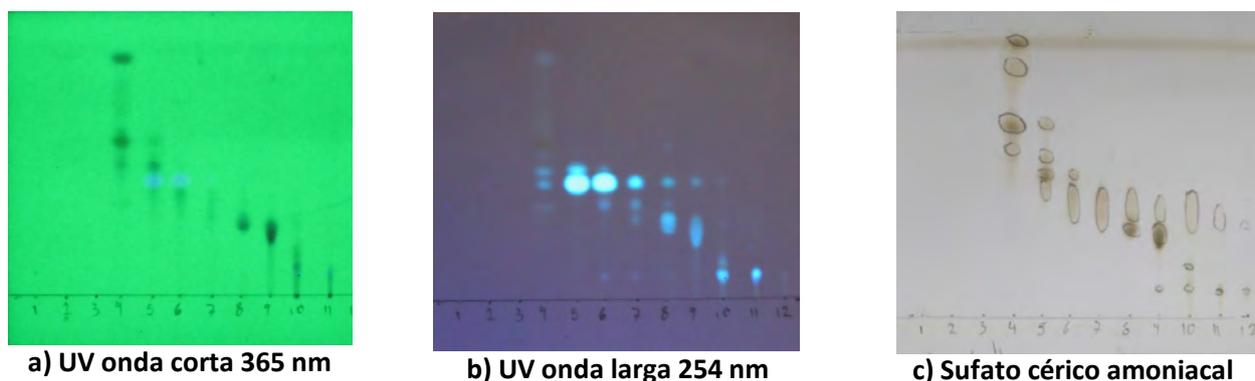


Figura 27. CCF de las fracciones obtenidas por CC del precipitado de *G. applanatum* no depurado *p(Fpp)*.

El sobrenadante del extracto inicial se evaporó y se separó por CC, utilizando como eluyente una mezcla 4:1 de hexano-AcOEt, con lo que se obtuvieron 15 fracciones que se analizaron por CCF (Figura 28).



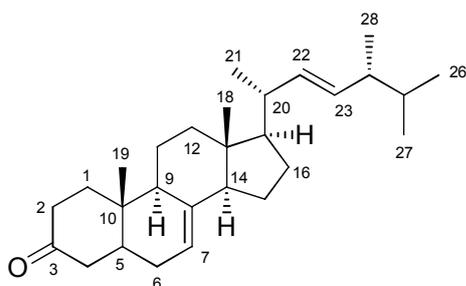
a) UV onda corta 365 nm

b) UV onda larga 254 nm

c) Sulfato cérico amoniacal

Figura 28. Cromatopla (CCF) del sobrenadante recuperado del extracto hexánico de *G. applanatum*, fraccionado en 15 eluatos revelados con luz UV de 365 nm (a) luz UV de 245(b) y sulfato cérico amoniacal (c).

Las fracciones 4 y 5 se unieron para realizar RMN de ^1H en CDCl_3 , el análisis de las señales de los espectros mostró un compuesto (50 mg) con una composición similar al obtenido de la fracción 9-33-7-BC de *G. curtisii* (ergosta-7,22-dien-3-ol), por lo que se realizó RMN de ^{13}C y al comparar la posición del carbono 3, se evidenció que se trata de un carbono de cetona, por lo que se determinó el compuesto como ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**) (Figuras 29 y 30), de igual forma se compararon los desplazamientos químicos obtenidos con los publicados para este compuesto (Tabla 10).



ergosta-7,22-dien-3-ona (4)

Figura 29. Estructura química del compuesto ergosta-7,22-dien-3-ona (4).

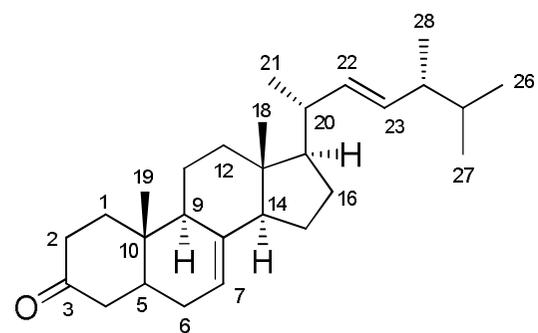
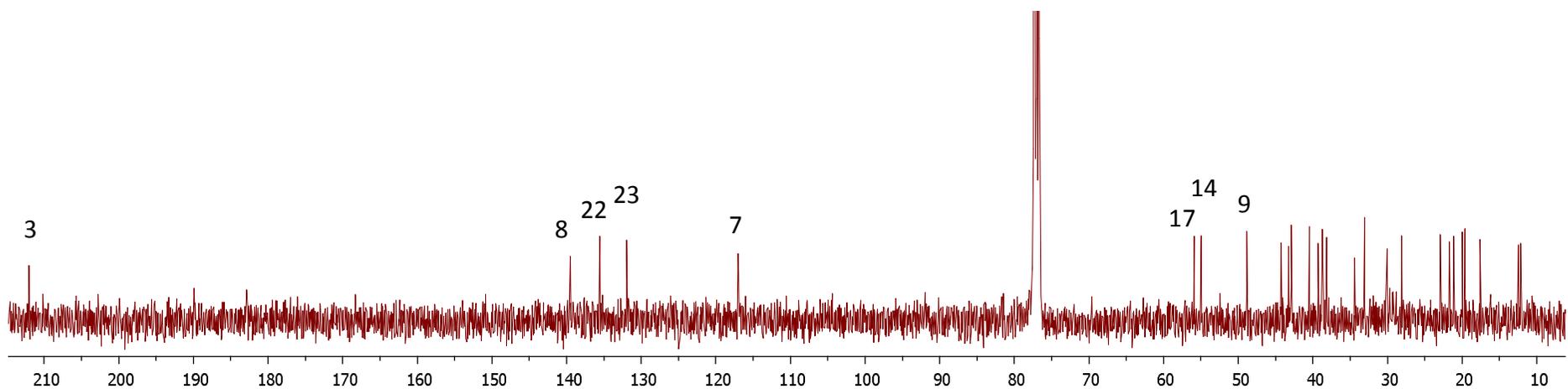
Tabla 10. Comparación de desplazamientos en RMN ^1H (5α -7-22-dien-3-ona).

Protón	δH (J Hz)		
	5α -7-22-dien-3-ona	Yang et al., 2014	Protiva et al., 1979
H22	5.2263 ($J = 7.0, 15.02$ Hz)(dd)	5.25-5.21 ($J = 12.0$ Hz)(t)	5.25
H7	5.18 (m)	5.16 (s)	5.14
H23	5.1647 ($J = 7.6, 15.1$ Hz)(dd)	5.25-5.21 ($J = 12.0$ Hz)(t)	5.25
H2 β	2.439 ($J = 14.6, 6$ Hz)(td)		
Me 21	1.0355 (s)	1.06 ($J = 6.6$ Hz)(d)	1.08
Me 19	1.0192(s)	1.26 (s)	1.03
Me 28	0.9189 ($J = 6.8$ Hz)(d)	0.96 ($J = 6.6$ Hz)(d)	0.97
Me 26	0.85 ($J = 6.3$ Hz)(d)	0.84 ($J = 6.6$ Hz)(d)	0.87
Me 27	0.818 ($J = 6.6$ Hz)(d)	0.86 ($J = 6.6$ Hz)(d)	0.78
Me 18	0.5769 (s)	0.60 (s)	0.58

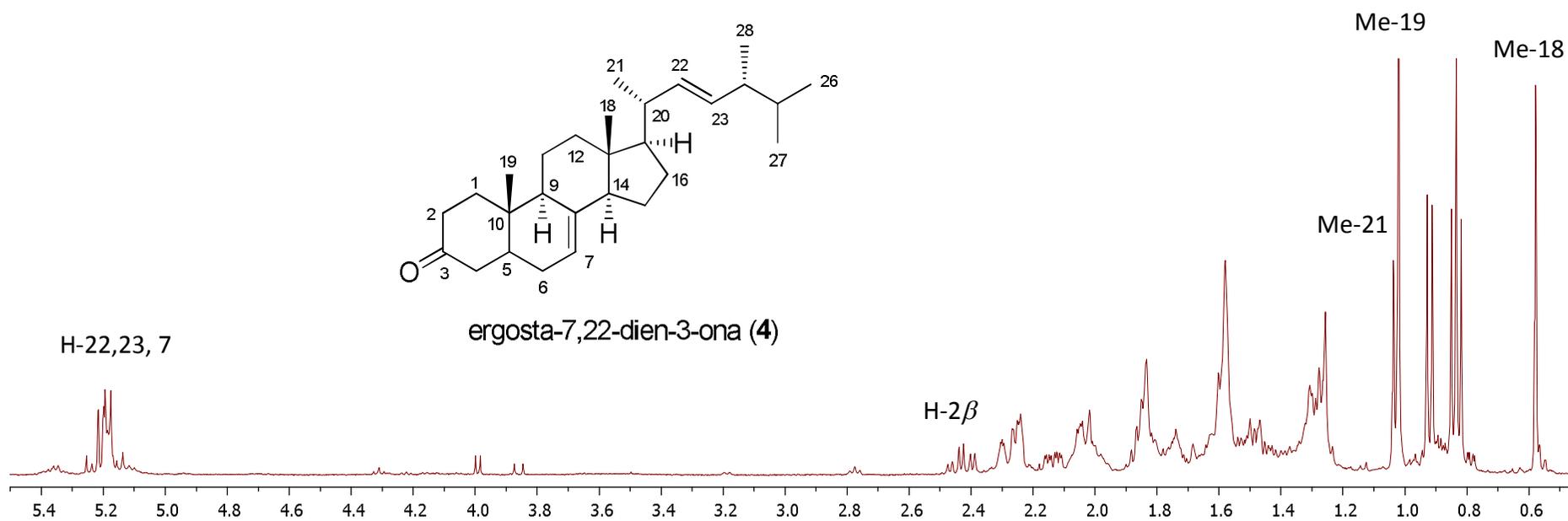
δ =desplazamiento químico de la señal (ppm)

J =Constante de acoplamiento (Hz)

Multiplicidad de la señal= d (doble), dd (doble de doble), m (múltiple), s (simple)



ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**)



H-22,23, 7

H-2 β

Me-21

Me-19

Me-18

Figura 30. Espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz) y ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la cetona **4** (fracción F 4-5), extr. hex. de *G. applanatum* (GaA-b).

Las fracciones 8 y 9 se reunieron (380 mg) para realizar una CC con hexano-AcOEt 8:2, hexano-AcOEt 1:1 y metanol, obteniendo 20 fracciones que se cromatografiaron por CCF con hexano-AcOEt 8:2 (Figura 31), al analizarse por RMN de ^1H las fracciones 12-13 (222 mg) se obtuvo el compuesto **2** con restos de **3** y **1**, mientras que en la fracción 19 se aisló compuesto **3** (12.9 mg).

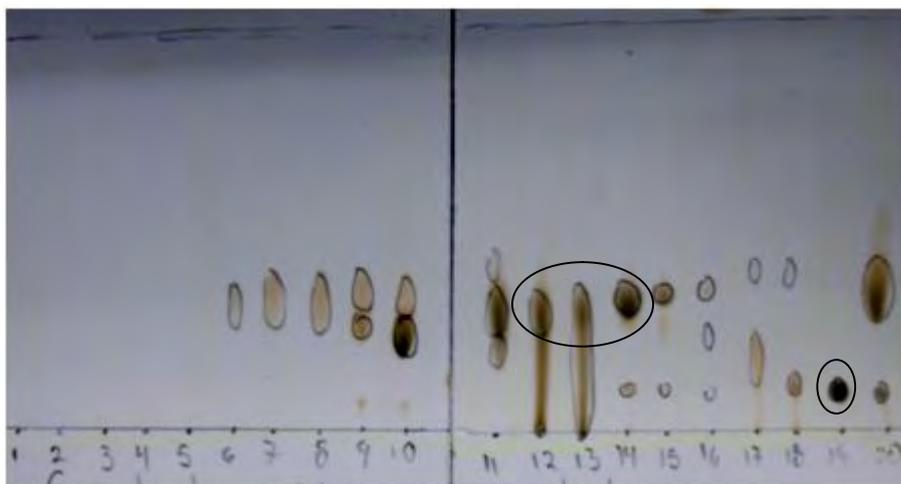


Figura 31. Análisis TLC de la fracción 8-9 del extracto hexánico de *G. applanatum*.

En resumen, se identificaron cuatro compuestos esteroideos, 3 de ellos para *G. curtisii* y 2 para *G. applanatum* como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Esteroles identificados para *G. curtisii* y *G. applanatum*.

	ESTEROL	ESPECIE
1	(3 β ,22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol)	<i>G. curtisii</i> , <i>G. applanatum</i>
2	ergosta-7,22-dien-3-ol (estelasterol)	<i>G. curtisii</i>
3	5 α ,8 α -epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol (peróxido de ergosterol)	<i>G. curtisii</i>
4	ergosta-7,22-dien-3-ona	<i>G. applanatum</i>

9.7 COMPARACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS

El análisis de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de los extractos hexánicos de las muestras de *G. curtisii* confirma la presencia de los esteroides 1, 2 y ácido oleico en basidiomas silvestres, además del compuesto 4 en basidiomas y micelio cultivados (Figuras 32 y 33). Por otra parte, *G. applanatum* y *G. brownii*, contienen 1, 2, 4, ácido oleico, ácido linoléico y compuestos grasos (Figura 34). En la tabla 12 se aprecian las proporciones relativas de los compuestos encontrados expresadas en porcentaje y sus tiempos de retención.

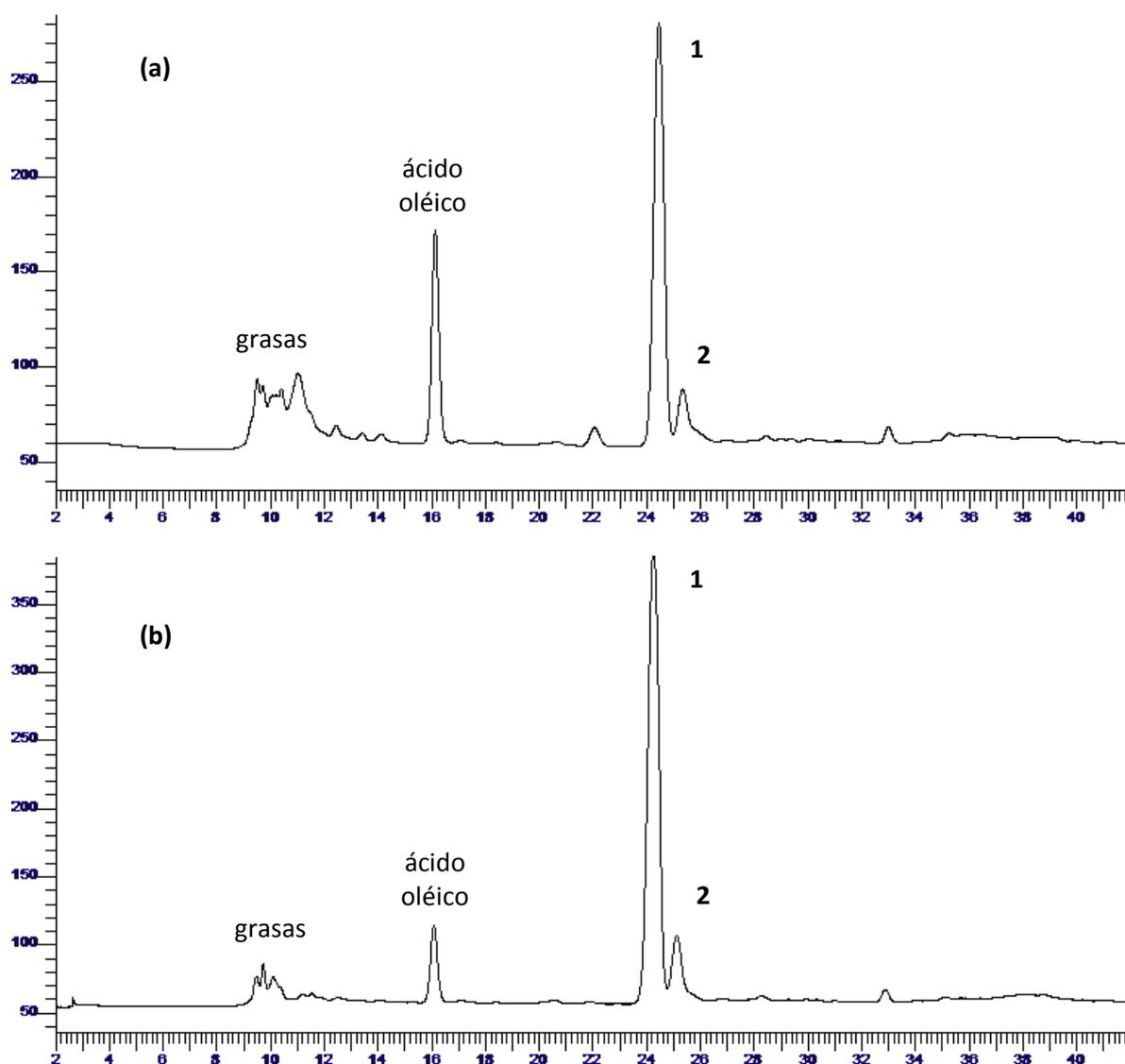


Figura 32. Perfil cromatográfico (HPLC) de los extractos hexánicos de *G. curtisii*: GcZ-b (a) y GcT-b (b).

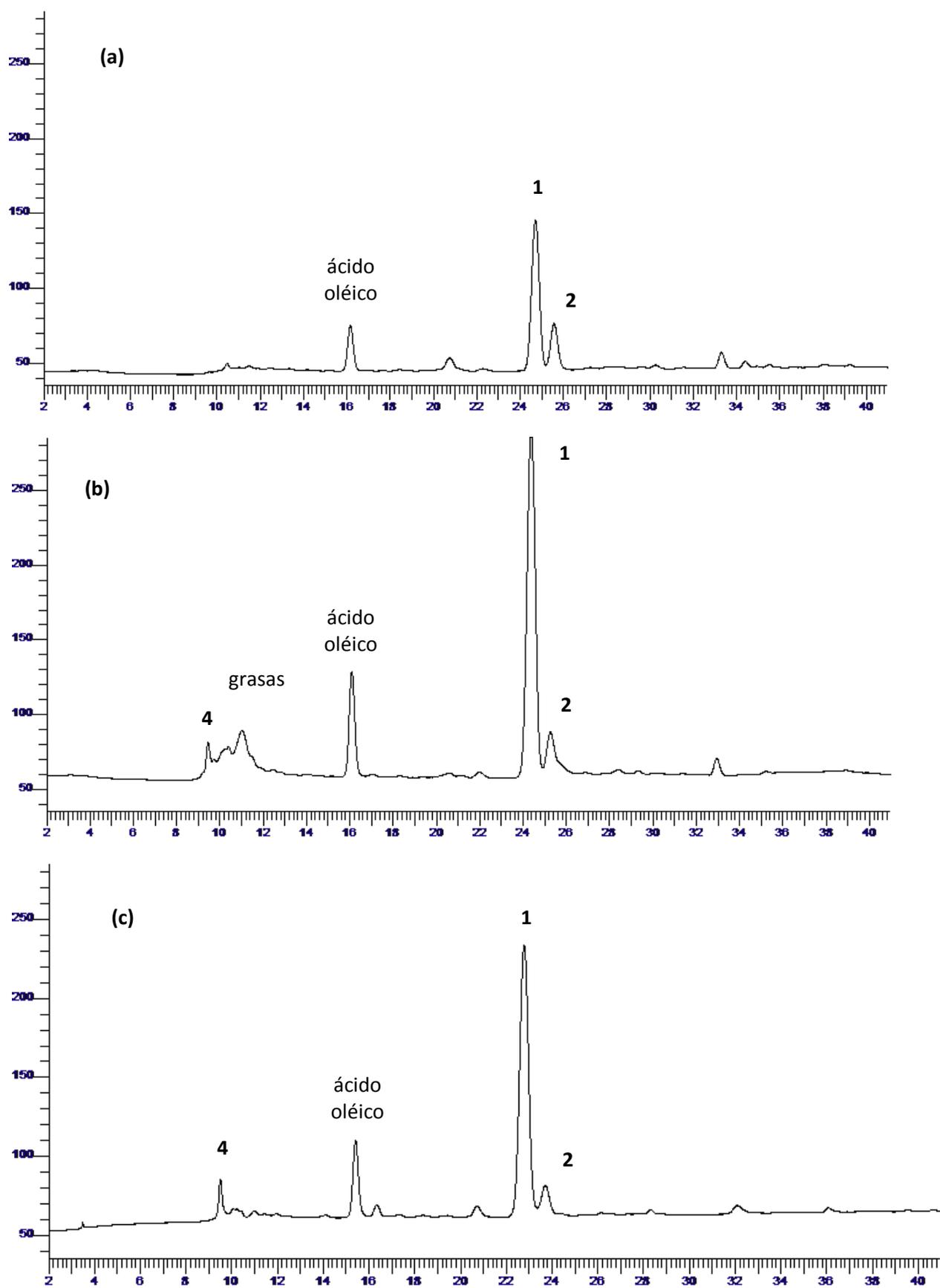


Figura 33. Perfil cromatográfico (HPLC) de los extractos hexánicos de *G. curtisii*: GcA-b (a), GcA-bc (b) y GcA-m (c).

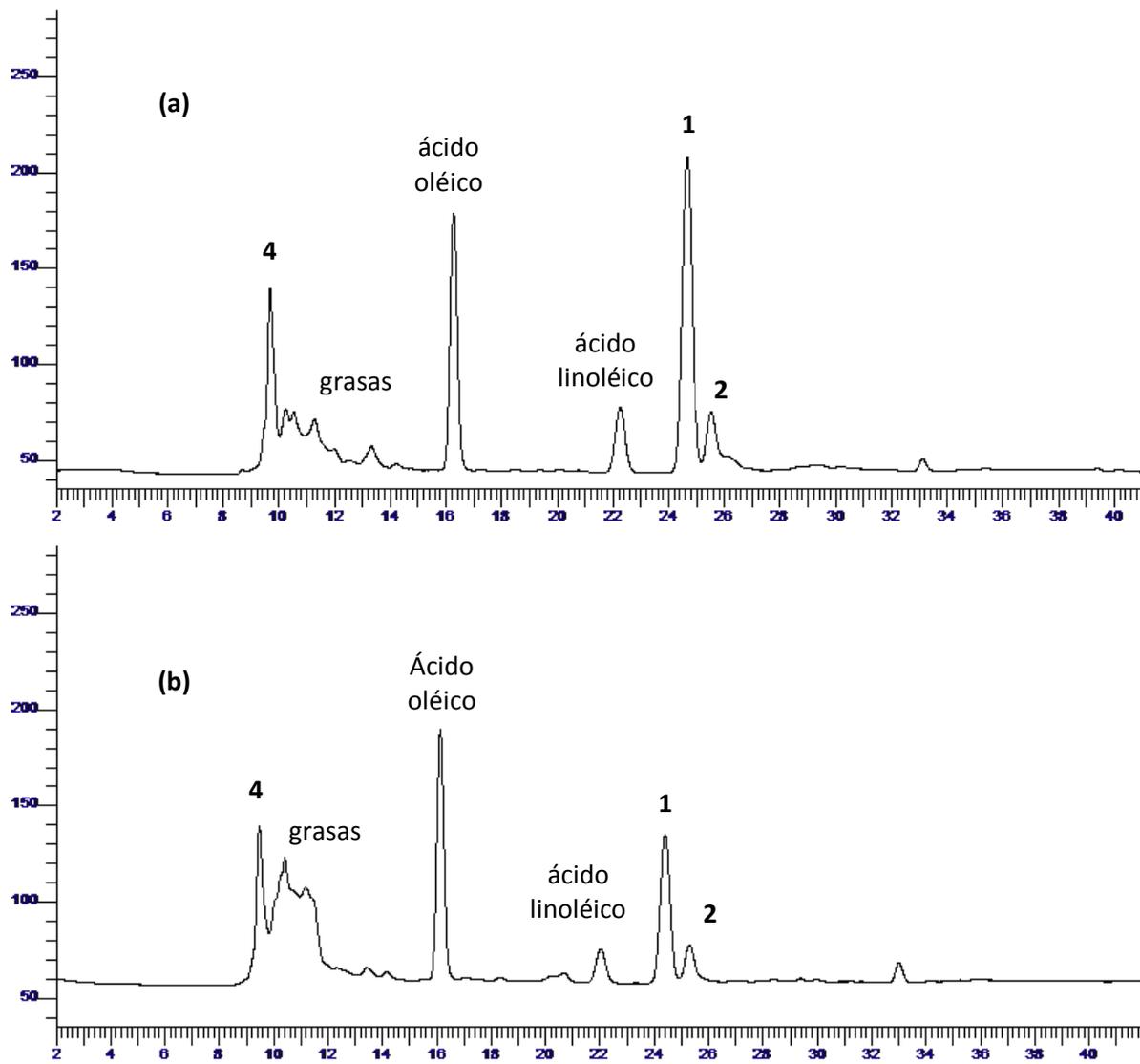


Figura 34. Perfil cromatográfico (HPLC) de los extractos hexánicos de *G. applanatum* GaA-b (a) y *G. brownii* GbT-b (b).

Tabla 12. Tiempos de retención (TR) y proporción relativa (%) de los compuestos identificados (HPLC) en *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*.

Compuesto	CcZ-b		GcT-b		GcA-b		GcA-bc		GcA-m		GaA-b		GbT-b	
	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%
1	24.5	43.3	24.3	66.9	24.7	52.9	24.3	66.9	22.8	65.9	24.7	30.2	24.4	15.2
2	25.3	6.6	25.1	10.0	25.6	15.8	25.1	10.0	23.7	6.4	25.5	4.0	25.3	4.0
4							9.5	3.1	9.5	4.0	9.6	14.4	9.5	13.6
ácido oléico	16.1	15.1	16.1	7.3	16.2	11.7			15.4	11.8	16.3	18.3	16.1	18.4
ácido linoléico											22.3	6.4	22.0	3.4
grasas	9.5	5.0	9.5	2.3							10.2	4.8	10.4	24.4
grasas	9.7	3.0	9.7	2.5			9.7	1.2			10.5	5.9	11.2	15.6
grasas	10.1	2.9	10.1	2.8			10.2	3.3			11.3	7.6		
grasas	10.4	3.3					10.4	2.2			12.0	1.9		
grasas											12.6	1.1		
grasas											13.3	2.8		

9.8 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

9.8.1 Actividad radicalaria Método ABTS

Para evaluar la actividad antioxidante se compararon nueve muestras de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii* correspondientes a basidiomas silvestres, micelio y basidiomas cultivados, como se describe en la tabla 2.

De acuerdo con el análisis de varianza se observaron diferencias significativas entre los diferentes extractos analizados, con respecto a su concentración expresada en mgTrolox/g muestra, con una $F_{9,20} = 74.03$ con un valor de $P < 0.0001$.

En los extractos hexánicos, los valores más altos se obtuvieron en basidiomas de *G. brownii* (GbT-m, 41.49 mgTrolox/g), *G. brownii* (GbT-b, 37.32 mgTrolox/g), *G. curtisii* (GcA-m, 34.46 mg Trolox/g) y *G. applanatum* (GaA-b, 36.17 mgTrolox/g); los valores intermedios se localizaron en *G. applanatum* (GaA-b, 34.53), *G. curtisii* (GcA-bc, 34.45), y los valores más bajos se observaron en *G. curtisii* (GcZ-b, GcT-b y GcA-b, con valores de 30.27, 29.84 y 28.55 mgTrolox/g. El análisis de datos mediante un ANOVA y una prueba de Tukey, confirmaron que existen diferencias significativas al integrar 5 grupos (Figura 35).

Extractos hexánicos

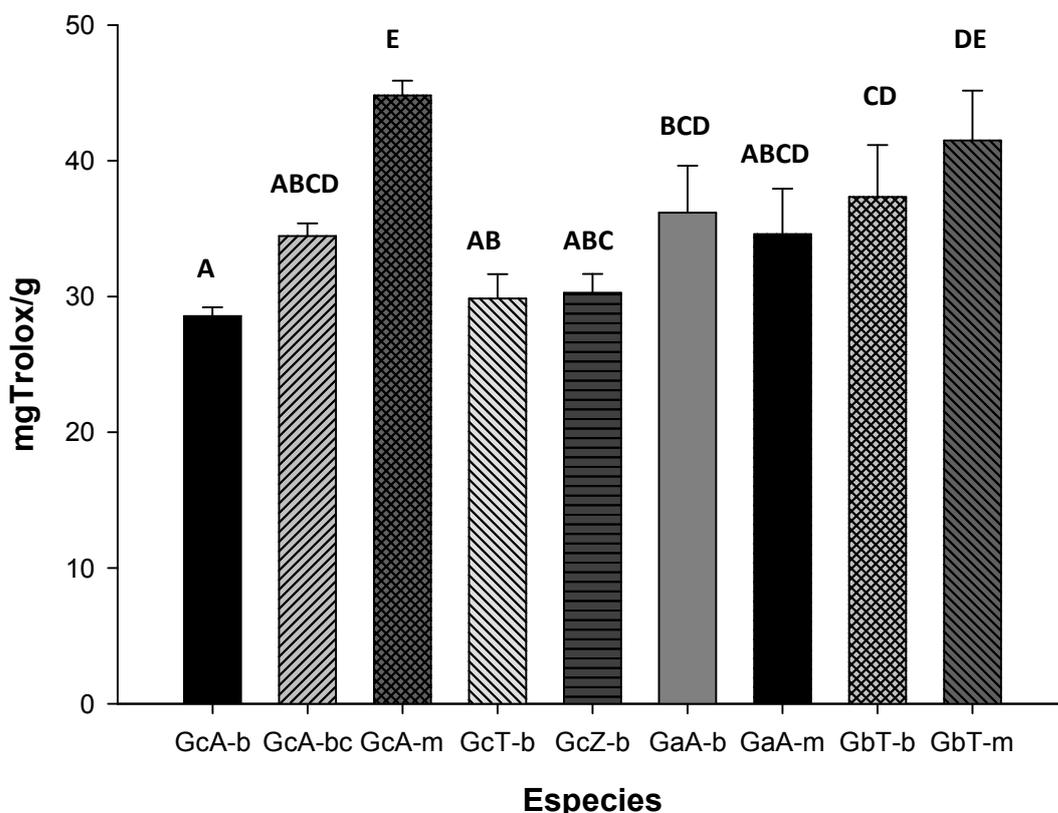


Figura 35. Actividad radicalaria de los extractos hexánicos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, el valor promedio (n=3) se expresa en mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mgTrolox/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

En el caso de los extractos etanólicos la mayor actividad antioxidante se observó en *G. brownii* (GbT-b y GbT-m con 68.54 y 67.82 mg Trolox/g) y *G. applanatum* (GaA-b con 67.53 mg Trolox/g), seguidos por *G. curtisii* (GcZ-b con 66.38 mg Trolox/g) y *G. curtisii* (GcA-b con 64.94 mg Trolox/g); los extractos con actividad intermedia fueron *G. curtisii* (GcT-b y GaA-m con 53.29 y 52 mg Trolox/g respectivamente). Por otra parte, se obtuvo la menor actividad en *G. curtisii* (GcA-m y GcA-bc) con valores de 50.41 y 47.82 mg Trolox/g, respectivamente. El análisis ANOVA de los datos y la prueba de Tukey dieron como resultado la formación tres grupos (Figura 36).

Extractos etanólicos

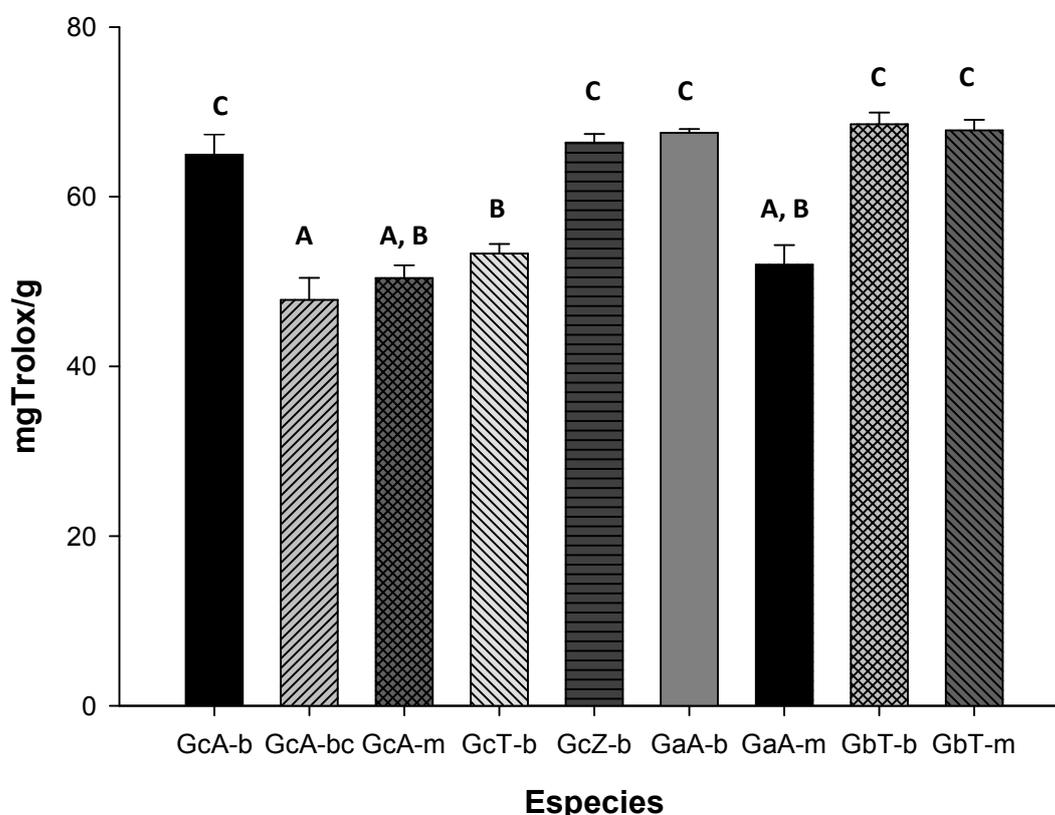


Figura 36. Actividad radicalaria de los extractos etanólicos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, el valor promedio (n=3) se expresa en mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mg Trolox/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

El análisis de los datos obtenidos de los extractos acuosos reveló como resultado la formación de cuatro grupos mediante la prueba de Tukey. Los valores más altos fueron para *G. applanatum* (GaA-m, 67.96 mg Trolox/g) *G. brownii* (GbT-b, 66.81 mg Trolox/g), *G. curtisii* (GcA-m, 66.38 mg Trolox/g) y *G. brownii* (GbT-m, 65.24 mg Trolox/g), los valores intermedios fueron para *G. curtisii* (GcT-b, 64.8 mg Trolox/g) y *G. applanatum* (GaA-b, 61.63 mg Trolox/g); mientras que los valores más bajos se observaron en *G. curtisii* (GcZ-b, GcA-bc y GcA-b, con 59.91, 59.76 y 56.45 mg Trolox/g respectivamente) (Figura 37).

Extractos acuosos

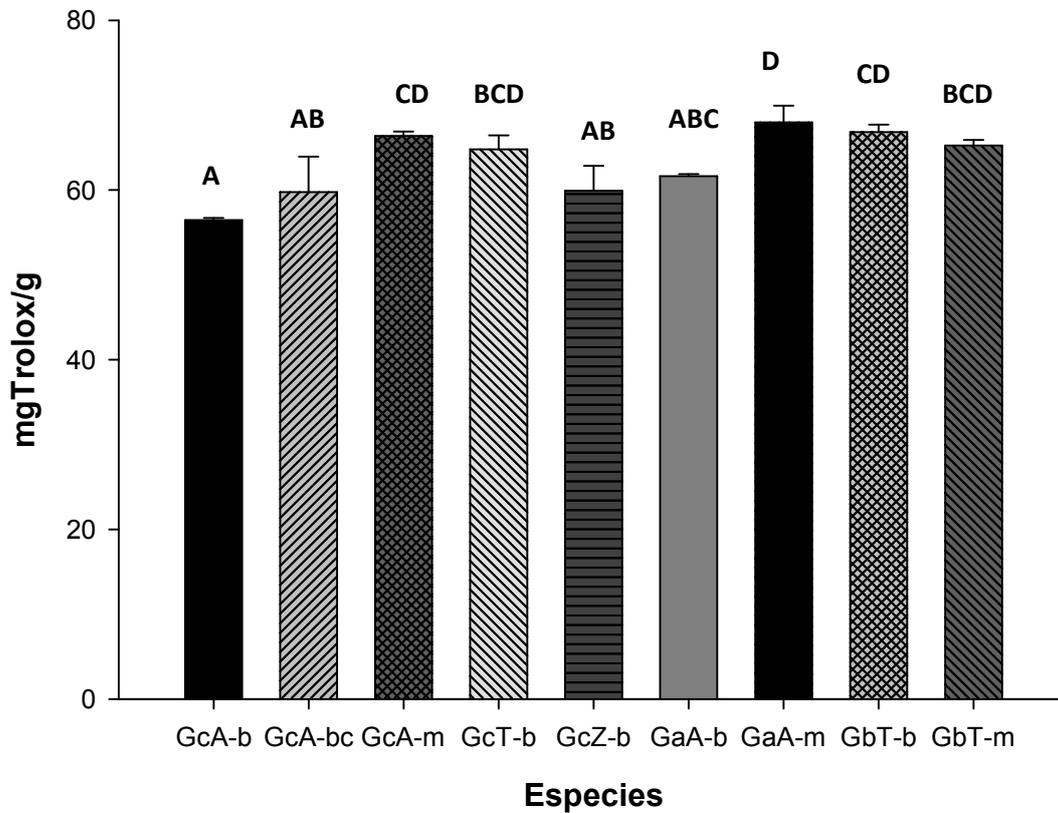


Figura 37. Actividad radicalaria de los extractos acuosos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, el valor promedio (n=3) se expresa en mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mg Trolox/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

Al comparar los valores obtenidos en todas las muestras, se observó que la mayor actividad radicalaria se expresa en los extractos acuosos, seguido de los etanólicos, siendo los hexánicos quienes presentaron los valores más bajos (Figura 38).

Actividad radicalaria

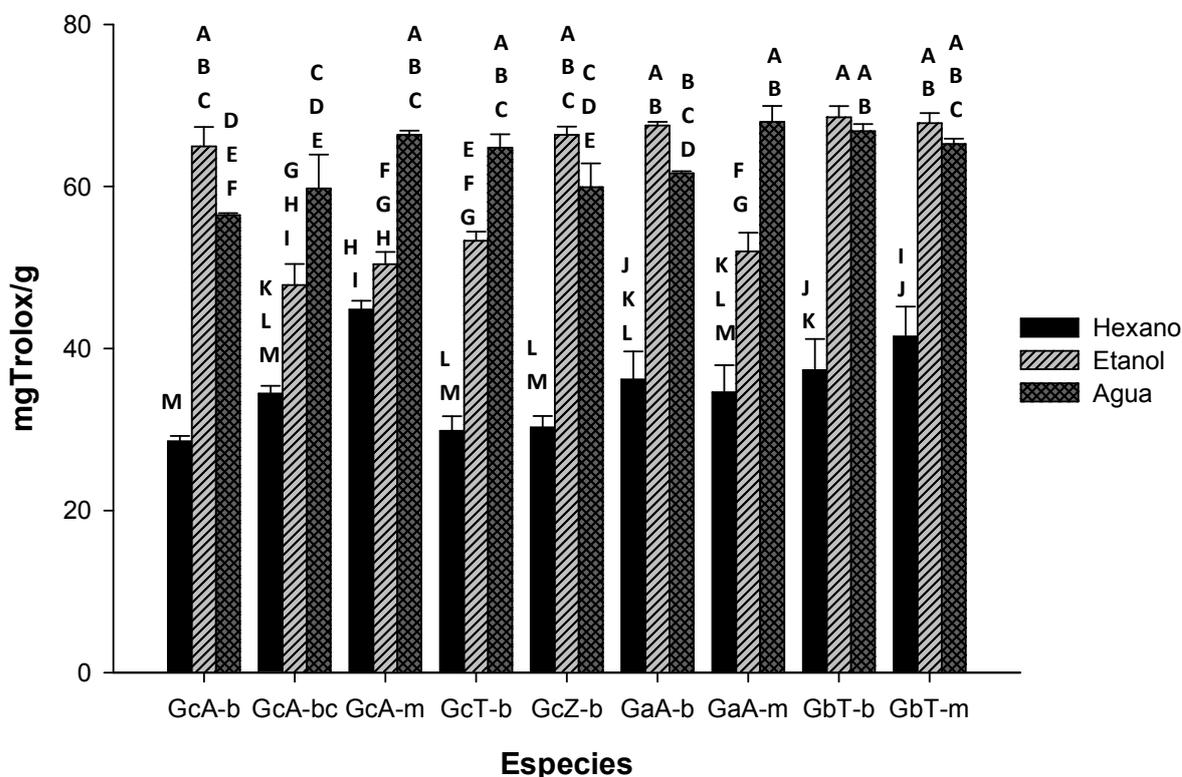


Figura 38. Actividad radicalaria de los extractos crudos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, valor promedio (n=3) expresado en mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mg Trolox/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha = 0.05$).

9.8.2 Cuantificación de fenoles totales Método de Folin Ciocalteu

El análisis de varianza de la concentración de fenoles totales expresada en mg EAG/g, mostró diferencias altamente significativas entre los extractos analizados, con una $F_{9,20} = 74.03$ y un valor de $P = < 0.0001$.

En los extractos hexánicos las mayores concentraciones de fenoles totales se encontraron en *G. applanatum* (GaA-m, 129.37) y *G. brownii* (GbT-m, 89.30), valores intermedios para *G. curtisii* (GcA-m, 53.64), *G. applanatum* (GaA-b, 51.07) y *G. curtisii* (GcT-b, 38.94 mg EAG/g) y los valores más bajos se encontraron en *G. curtisii* (GcZ-b, GcA-c, GcA-b 25.7, 22.11, 20.9 mg EAG/g) y *G. brownii* (GbT-b 21.29 mg EAG/g). Al realizar un ANOVA y una prueba de Tukey se evidenciaron diferencias significativas, organizando los datos en cinco grupos (Figura 39).

Extractos hexánicos

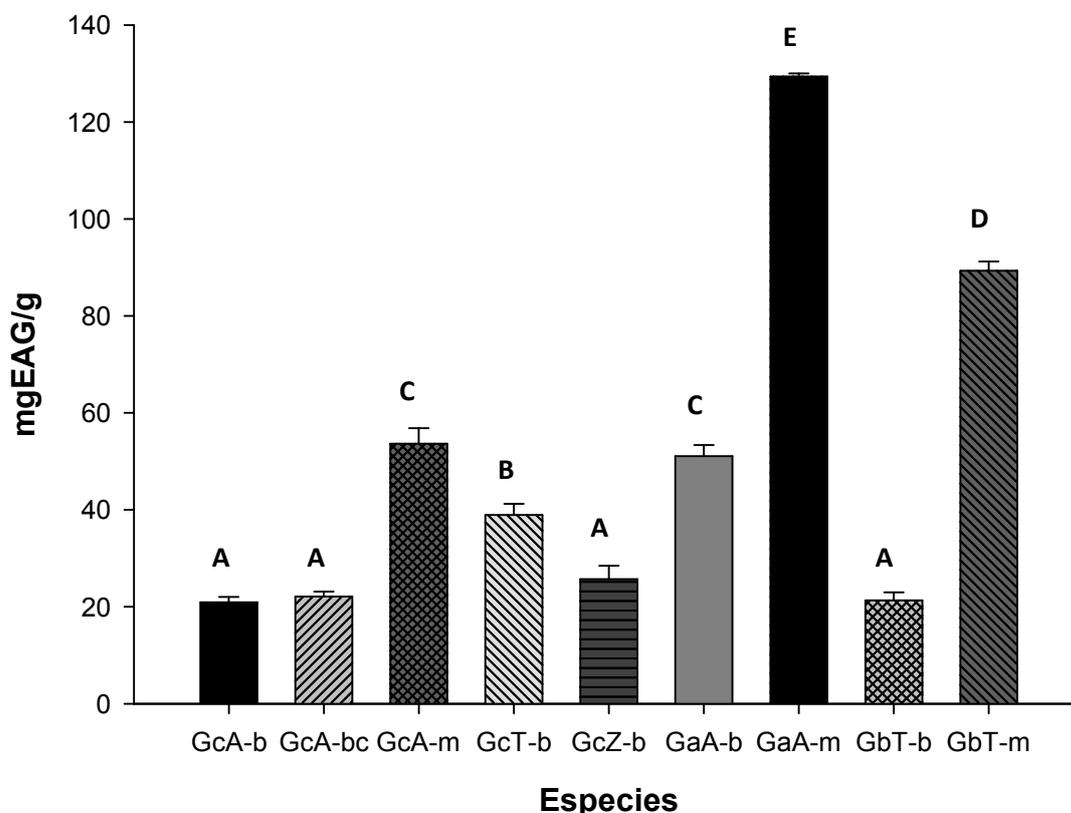


Figura 39. Cuantificación de fenoles totales en los extractos hexánicos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgEAG/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

Los extractos etanólicos con mayor concentración de fenoles totales fueron *G. brownii* (GbT-m, 100.33) y *G. applanatum* (GaA-b, 61.36), seguidos por *G. brownii* (GbT-b, 58.42) y *G. curtisii* (GcT-b, GcZ-b y GcA-bc con valores intermedios de 54.38, 43.35 y 38.57 mg EAG/g respectivamente). Así mismo, las muestras con menor concentración de fenoles fueron *G. applanatum* (GaA-m, 27.91 mg EAG/g) y *G. curtisii* (GcA-b y GcA-m con valores de 19.09 y 13.57 mg EAG/g). Los datos analizados mediante ANOVA y Tuckey formaron siete grupos que evidencian diferencias significativas entre las muestras (Figura 40).

Extractos etanólicos

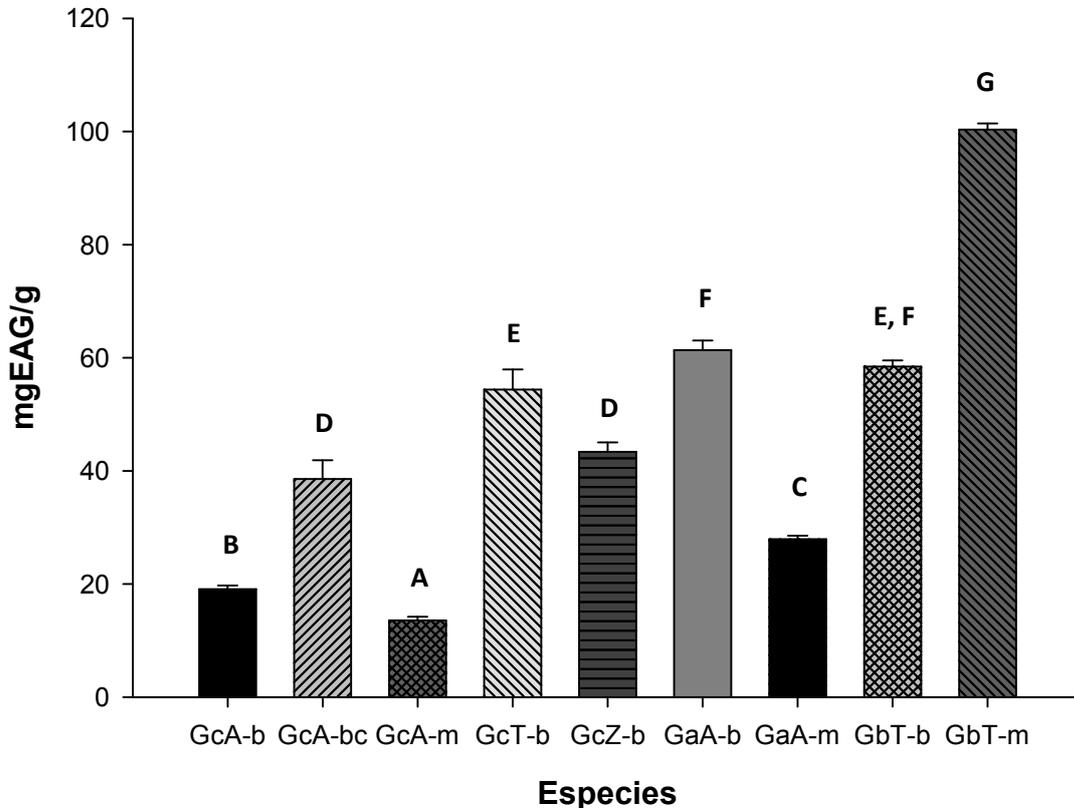


Figura 40. Cuantificación de fenoles totales en los extractos etanólicos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgEAG/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

Los resultados observados para extractos acuosos, sitúan los valores más altos de fenoles totales para *G. curtisii* (GcA-bc, 146.64 mg EAG/g), *G. brownii* (GbT-b, 104.37 mg EAG/g) y *G. curtisii* (GcA-m, 96.65 mg EAG/g); con valores intermedios que corresponden a *G. curtisii* (GcA-b, GcZ-b, 84.52 y 72.39) y *G. brownii* (GbT-m 63.94). Finalmente la menor cantidad de fenoles se obtuvo en *G. curtisii* (GcT-b, 55.11 mg EAG/g) y *G. applanatum* (GaA-b y GaA-m, con 58.79 y 47.76 mg EAG/g). Al realizar el análisis ANOVA y la prueba de Tukey se distinguen nueve grupos que reflejan diferencias significativas entre todas las muestras ensayadas (Figura 41).

Extractos acuosos

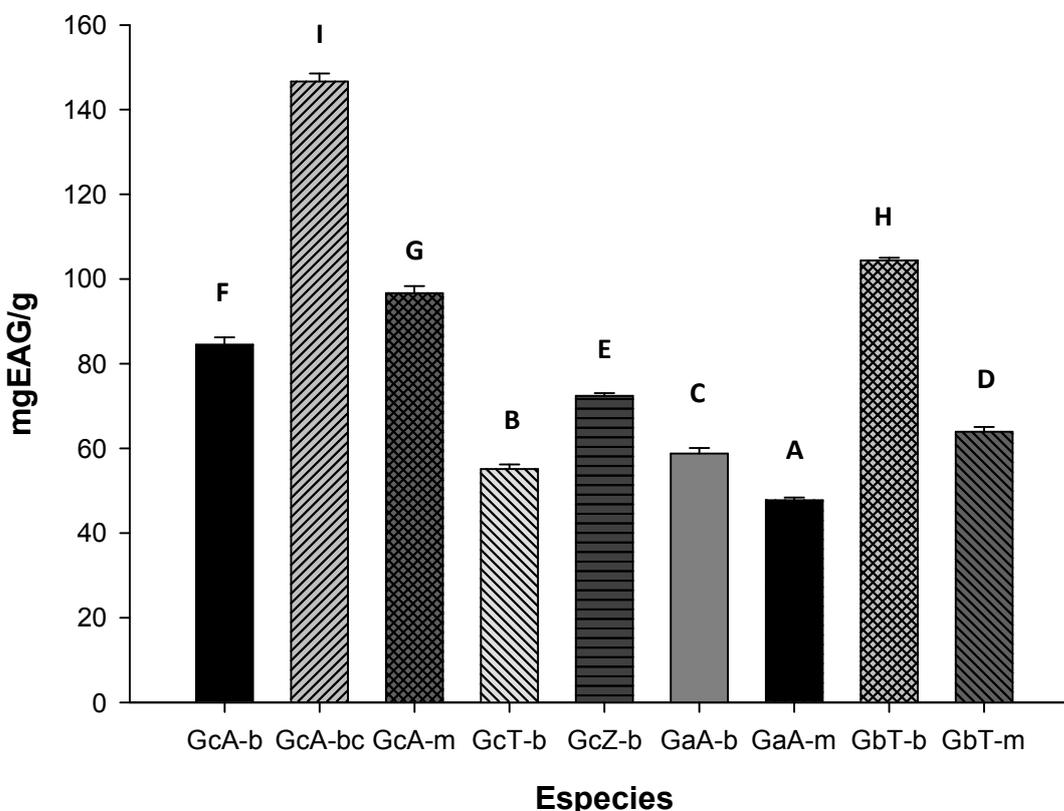


Figura 41. Cuantificación de fenoles totales en los extractos acuosos de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgEAG/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$).

Para comprobar la relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, se realizó una prueba de correlación para los extractos etanólicos y acuosos por separado, en el que se observó que la actividad antioxidante (mg Trolox/g) no se correlaciona con el contenido de polifenoles (mg EAG/g), existiendo un valor de $R^2=0.16$ para los extractos etanólicos y de 0.016 en los acuosos.

Al observar de manera conjunta los resultados de todos los extractos se puede apreciar que los valores más altos se presentaron en especies cultivadas como ocurre en los extractos acuosos de *G. curtisii* basidioma cultivado (Gc-A-bc) y micelio (Gc-A-m), en el etanólico de *G. brownii* (Gb-T-m) y en el extracto hexánico del micelio de *G. applanatum* (Ga-A-m) (Figura 42).

Polifenoles totales

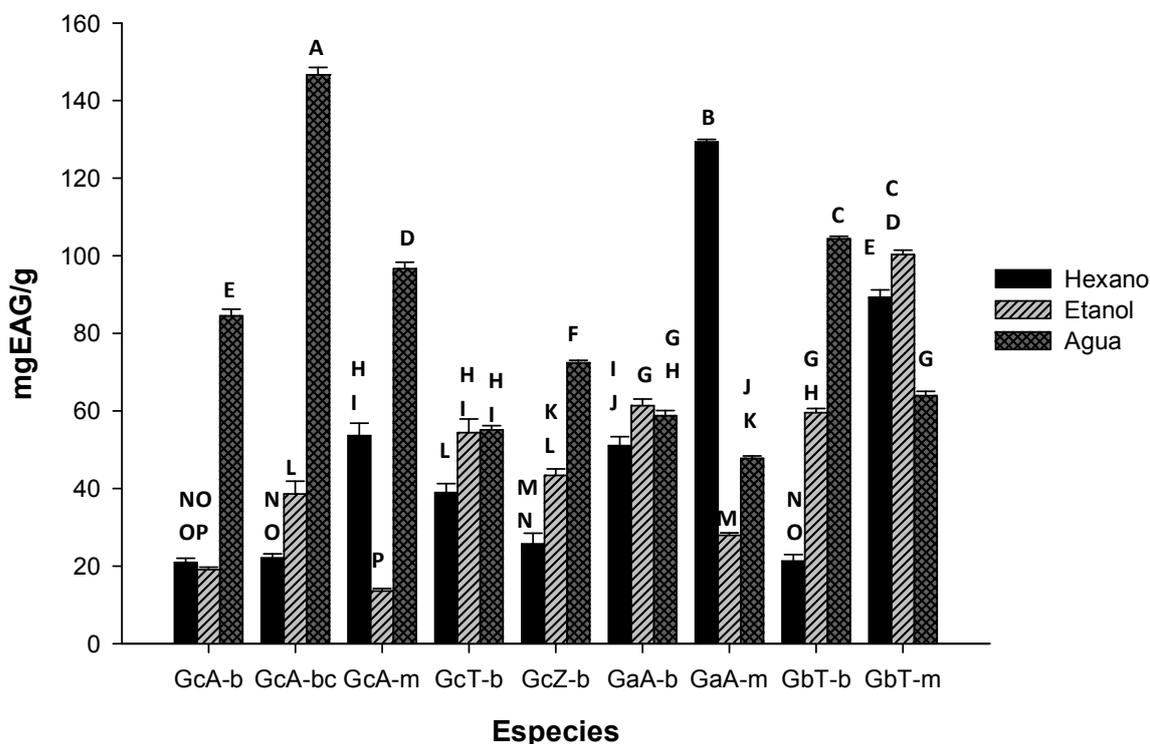


Figura 42. Cuantificación de fenoles totales en los extractos crudos de *G. curtisii*, *G. appianatum* y *G. brownii*, expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha = 0.05$).

En el análisis discriminante generalizado AFDG de la actividad antioxidante y de fenoles totales, se obtuvo que el 70.43% de la varianza se explicó por el contenido de fenoles de los extractos acuosos mg EAG/g ($r = -0.828$) y por los mg Trolox/g de los extractos etanólicos ($r = -0.405$) en la primera función discriminante (FD1). Por otra parte, para la segunda función discriminante (FD2) las variables que más se correlacionaron fueron fenoles de los extractos etanólicos mg EAG/g ($r = 0.481$), fenoles con hexano ($r = 0.351$) y antioxidantes de los extractos acuosos ($r = 0.261$) con lo cual se explicó el 18.57% de la variación total.

De manera que se obtuvieron siete grupos de acuerdo a su actividad antioxidante, El grupo I comprende las especies con un alto contenido de fenoles totales en los extractos acuosos. El grupo II lo conforman las especies con valores intermedios de fenoles (agua y hexano) y antioxidantes (etanol y agua) pero con una mayor capacidad antioxidante de los extractos en hexano. El grupo III se conformó por individuos con un alto contenido de fenoles de extractos en hexano y

antioxidantes acuosos. El grupo IV corresponde a especies con un bajo contenido de fenoles y antioxidantes en los extractos con hexano y etanol. El grupo V presentaron un alto contenido de antioxidantes y fenoles totales en los extractos acuosos y etanolicos, pero con bajos valore se fenoles totales en los extractos con hexano. El grupo VI se integró por GcZ-b que se caracterizó por bajos valores de antioxidantes en hexano y valores intermedios de antioxidantes y fenoles totales en los extractos acuosos y etanolicos. El grupo VII (GcT-b, GaA-b, Gbt-m) presentó valores intermedios de fenoles totales y antioxidantes en los extractos acuosos (Figura 43.).

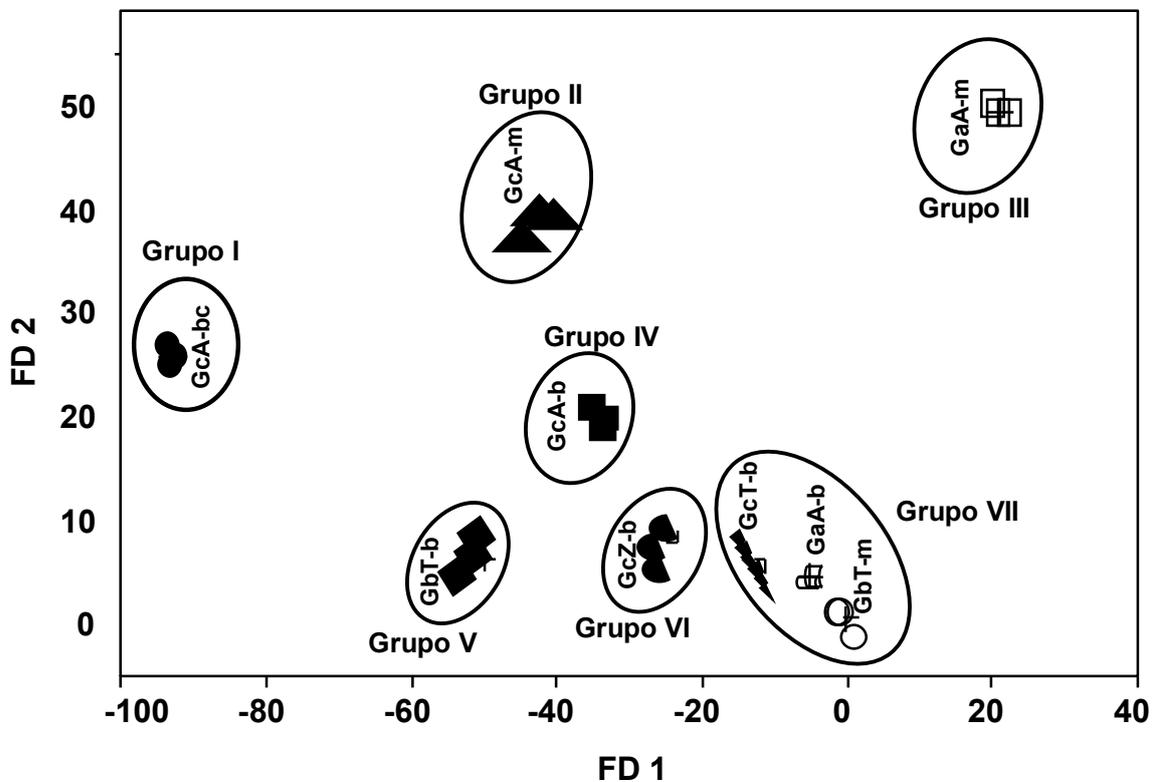


Figura 43. Análisis discriminante generalizado lineal (AFDG) de la actividad antioxidante de los extractos de *Ganoderma* spp. Grupo I: *G. curtisii* Acaxochitlán cultivado (GcA-bc); Grupo II: *G. curtisii* Acaxochitlán micelio (GcA-m); Grupo III: *G. applanatum* (GaA-m); Grupo IV: *G. curtisii* Acaxochitlán (GcA-b); Grupo V: *G. brownii* Tlanchinol (GbT-b); Grupo VI: *G. curtisii* Zacualtipán (GcZ-b); Grupo VII: *G. curtisii* Tlanchinol (GcT-b), *G. applanatum* Acaxochitlán (GaA-b) y *G. brownii* Tlanchinol micelio (GbT-m).

9.9 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

9.9.1 Línea celular CHOK-1

Se realizaron pruebas de citotoxicidad con el método MTT en cultivos de células sanas de ovario de hámster CHOK-1 (Figura 44), para evaluar las fracciones metanólica y hexánica de los extractos de *G. applanatum* y *G. curtisii* en diferentes concentraciones (1, 10, 20, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

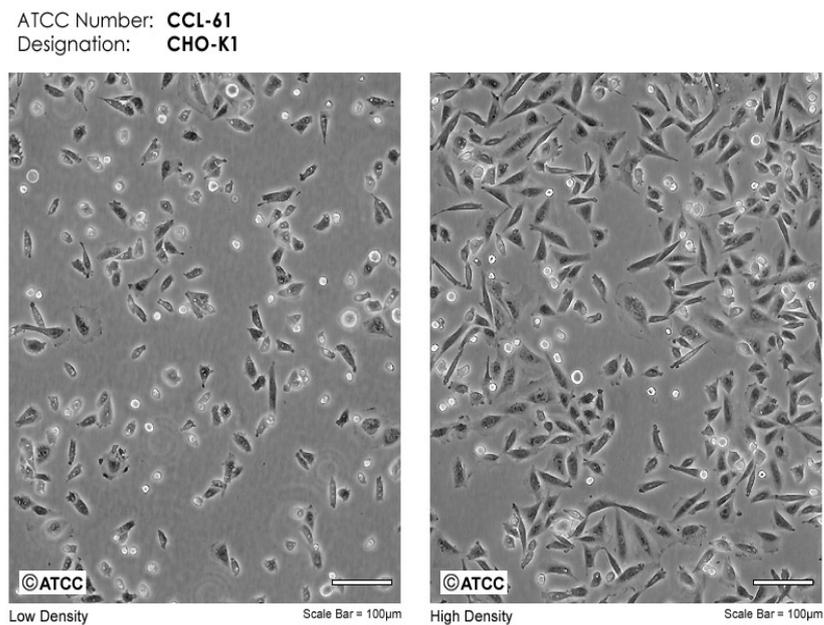
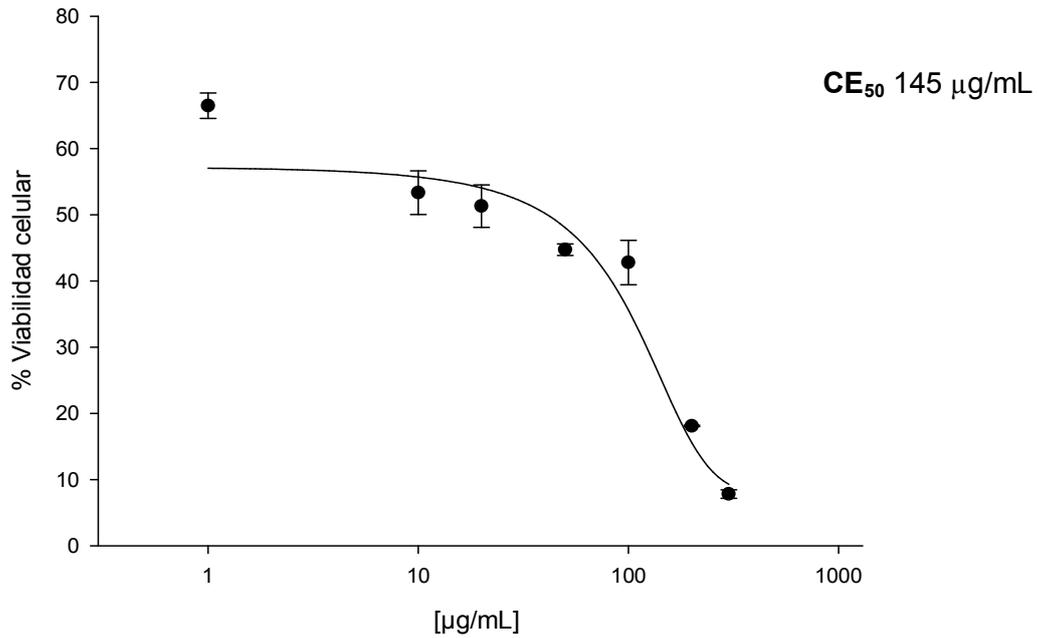


Figura 44. Morfología de la línea celular CHOK-1 en cultivo (Tomado de ATCC).

Para el extracto hexánico de *G. applanatum* se obtuvo un 57.3 % supervivencia celular en la concentración mínima (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de 7.8% en la máxima (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), calculándose la concentración efectiva 50 (CE_{50}) en 145 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el extracto metanólico presentó una viabilidad del 100% en la concentración mínima y de 7.9% en la máxima, con una CE_{50} de 148 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 45).

G. applanatum H



G. applanatum M

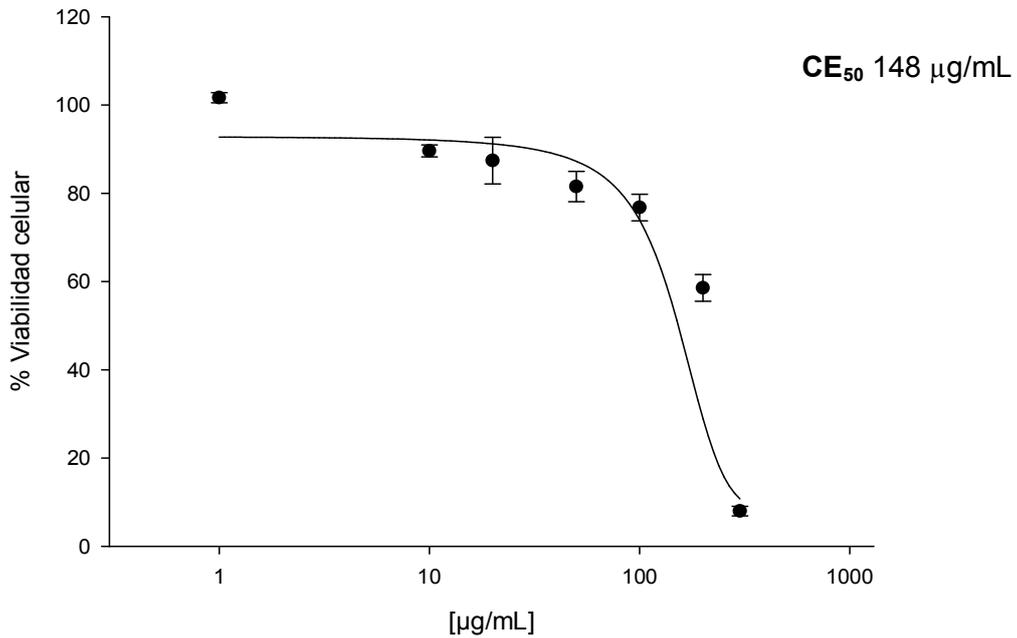


Figura 45. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de *G. applanatum* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHOK-1 cultivadas durante 24 hr.

En el caso de *G. curtisii* la fracción hexánica mostró una supervivencia celular del 67% en la concentración mínima y de 6.3% en la máxima, con una CE₅₀ de 150 µg/mL, en la fracción metanólica la viabilidad celular fue de 100% en la

concentración menor (1 $\mu\text{g/mL}$) y de 7.2% en la máxima (300 $\mu\text{g/mL}$), con una CE_{50} calculada en 61 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 46).

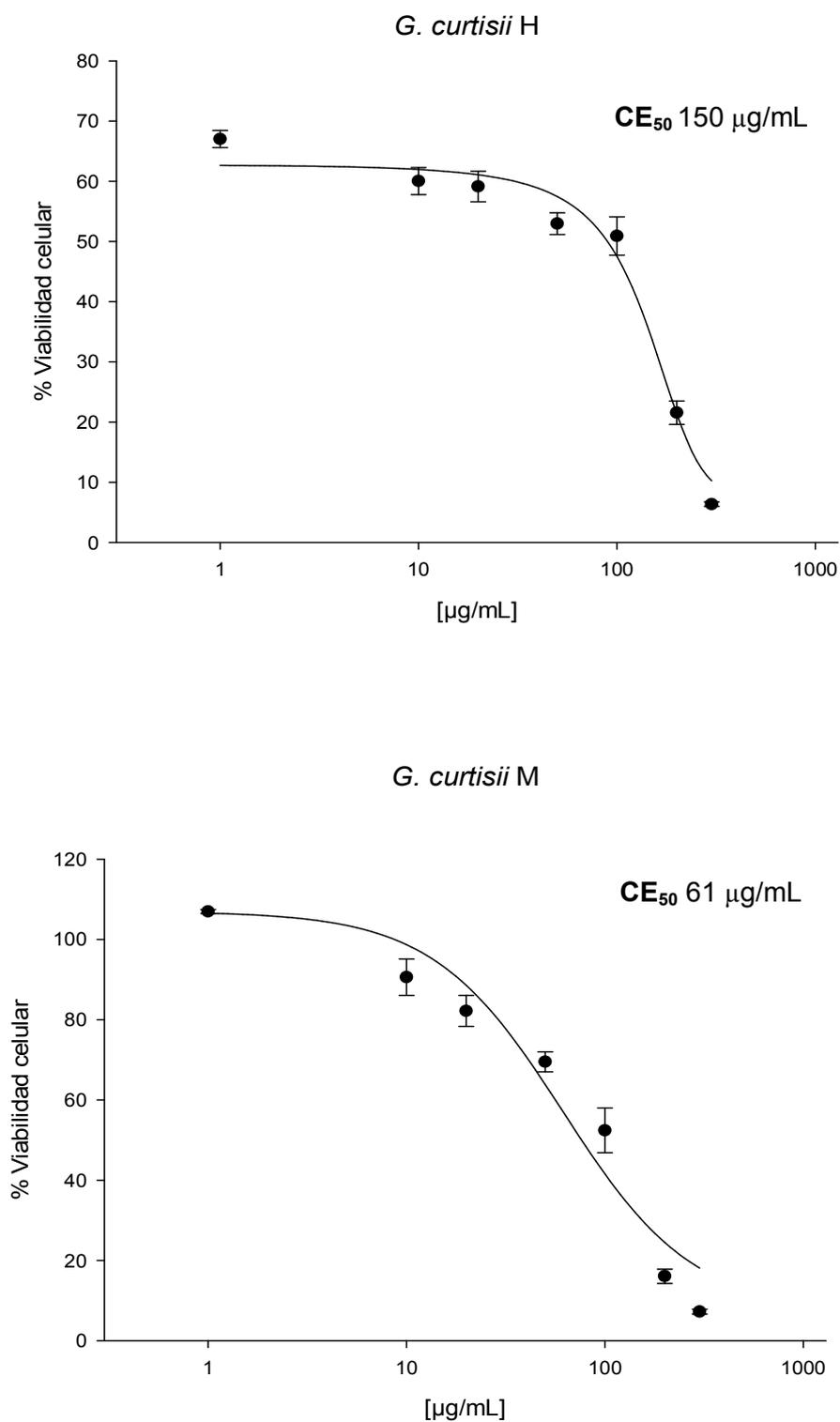


Figura 46. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de *G. curtisii* en concentraciones de 1 a 300 $\mu\text{g/mL}$ contra células CHOK-1 cultivadas durante 24 hr.

El estudio comparativo de los extractos evaluados confirma un mayor efecto citotóxico para la línea celular CHOK-1 de las fracciones hexánicas al inducir una muerte celular del 33% en el caso de *G. curtisii* y 43% en *G. applanatum* a partir de la dosis mas baja (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ubicando una CE_{50} cercana a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte, los extractos metanólicos fueron menos agresivos al permitir una supervivencia celular de 100% en la dosis inicial, misma que decrece conforme se aumenta la dosis, en el caso de *G. curtisii* se obtuvo una CE_{50} de 61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, menor al de las otras muestras (Figura 47).

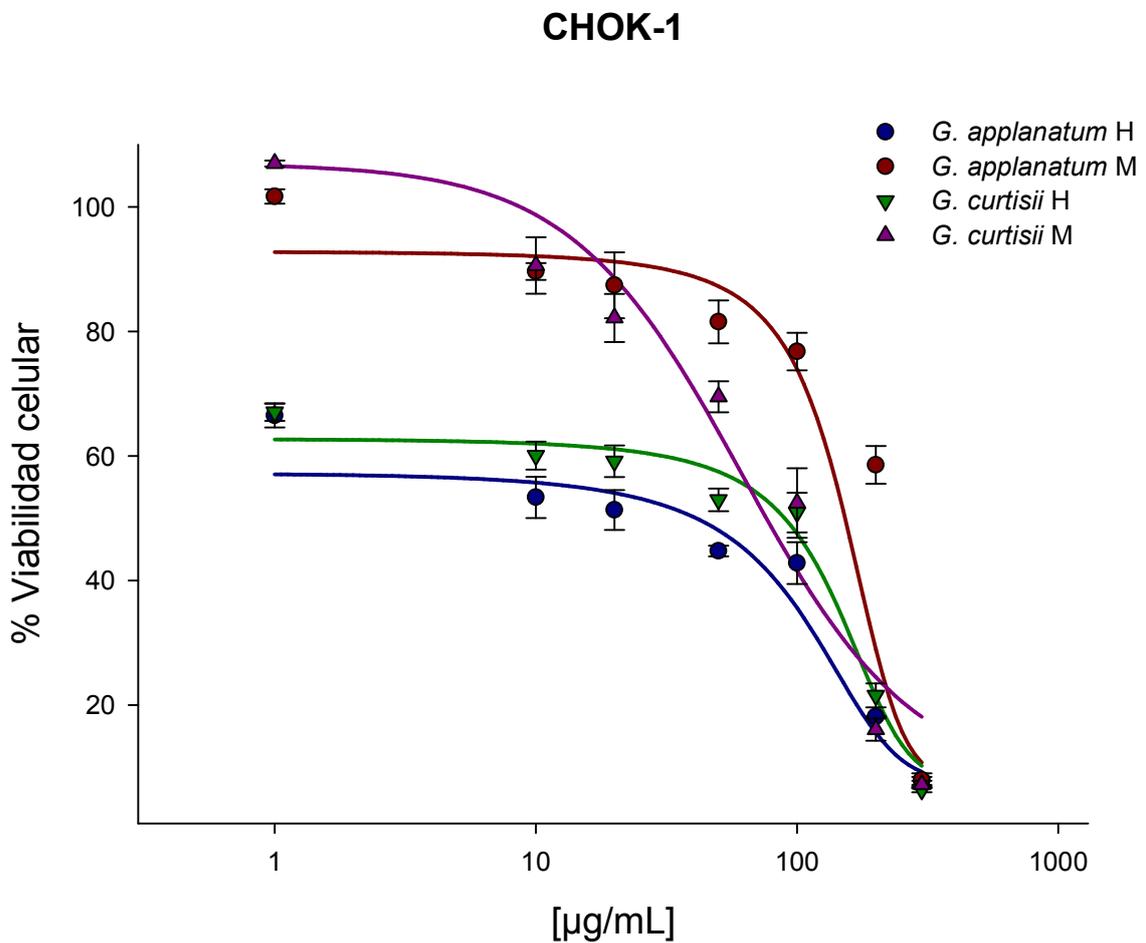


Figura 47. Comparación de las curvas dosis efecto (D-E) de los extractos de *G. applanatum* y *G. curtisii*, en concentraciones de 1 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a células CHOK-1.

9.9.2 Línea celular CHANG

La evaluación de la actividad citotóxica con células CHANG (células de hígado contaminadas con HeLa) (Figura 48) tuvo como resultado para la fracción hexánica de *G. applanatum* una supervivencia celular del 63% en la menor concentración del extracto y del 19% en la máxima, estimándose una CE_{50} de 63 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en la fracción metanólica la viabilidad fue de 89% en la menor concentración y 20% en la máxima, situando la CE_{50} en 169 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 49).

JCRB9066 : Chang Liver (08242001)

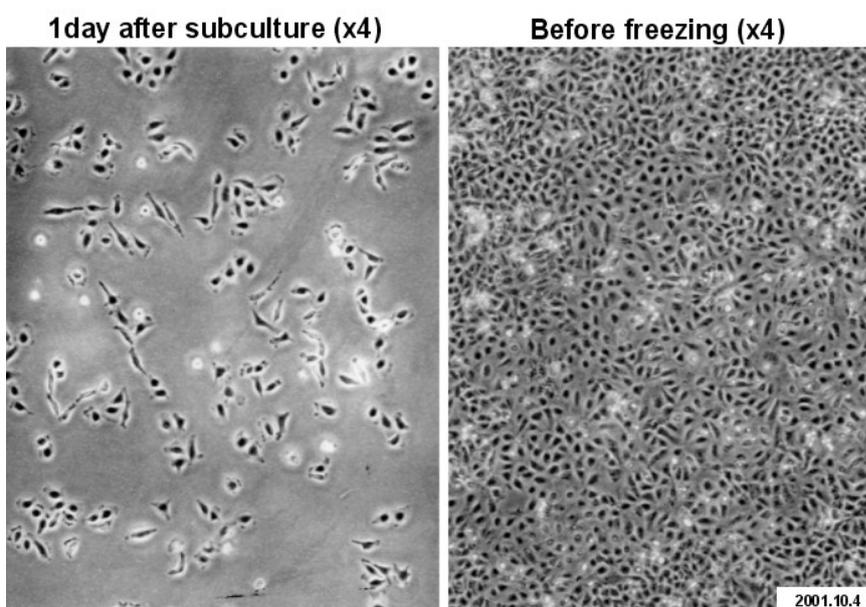


Figura 48. Morfología de las células CHANG en cultivo (Tomado de Cellbank).

Para *G. curtisii* el extracto hexánico mostró el 78% de supervivencia celular a 1 $\mu\text{g/mL}$ de concentración y de 14% a 300 $\mu\text{g/mL}$, con una CE_{50} ubicada en 64 $\mu\text{g/mL}$. Por otra parte, en el extracto metanólico la viabilidad fue de 88% en la concentración mínima y 15% en la máxima, estimando la CE_{50} en 106 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 50).

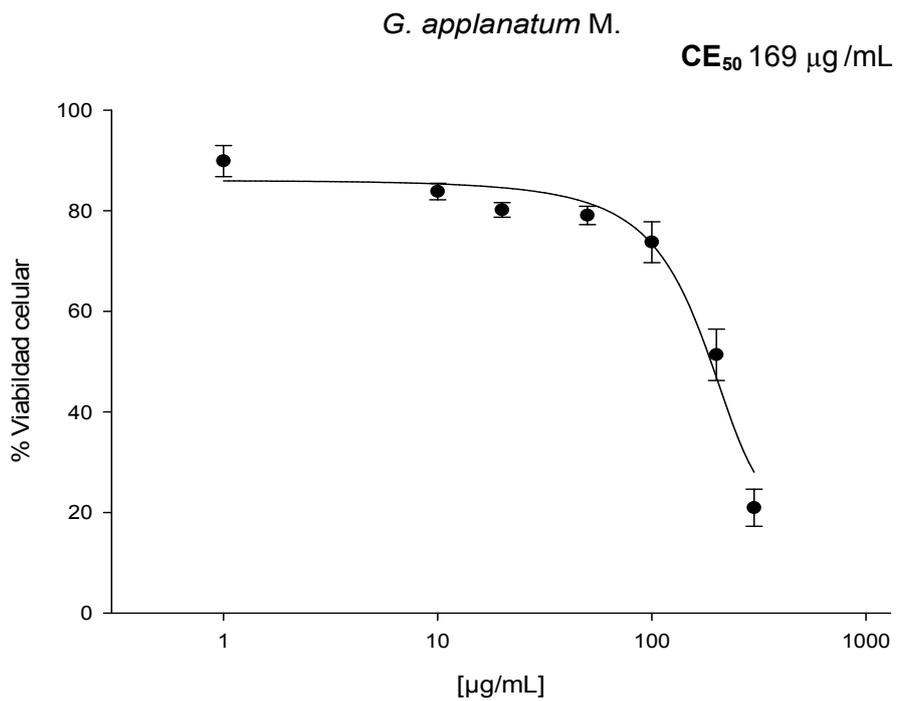
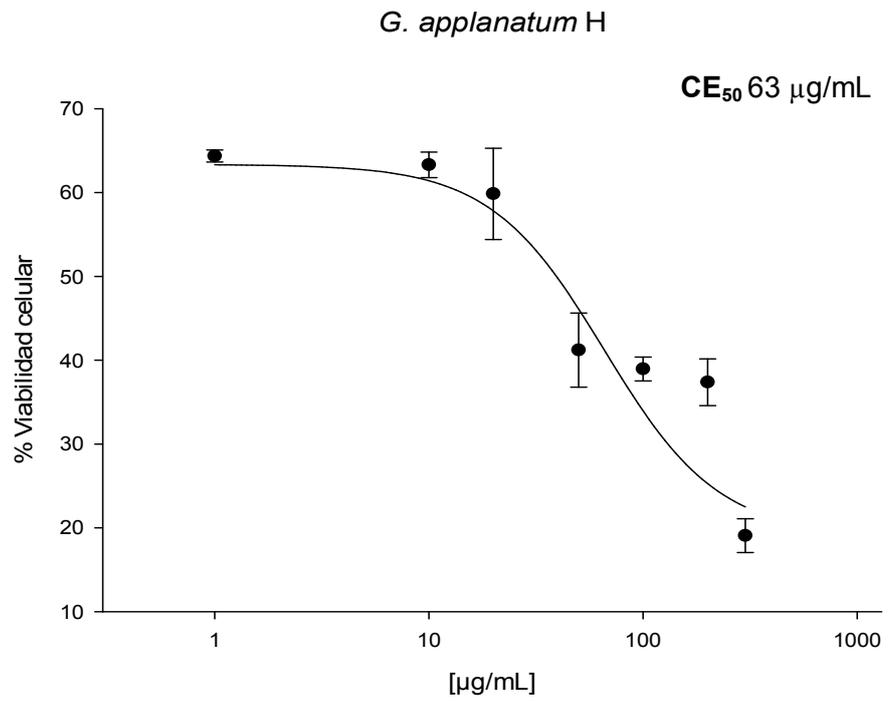


Figura 49. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de *G. applanatum* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHANG cultivadas durante 24 hr.

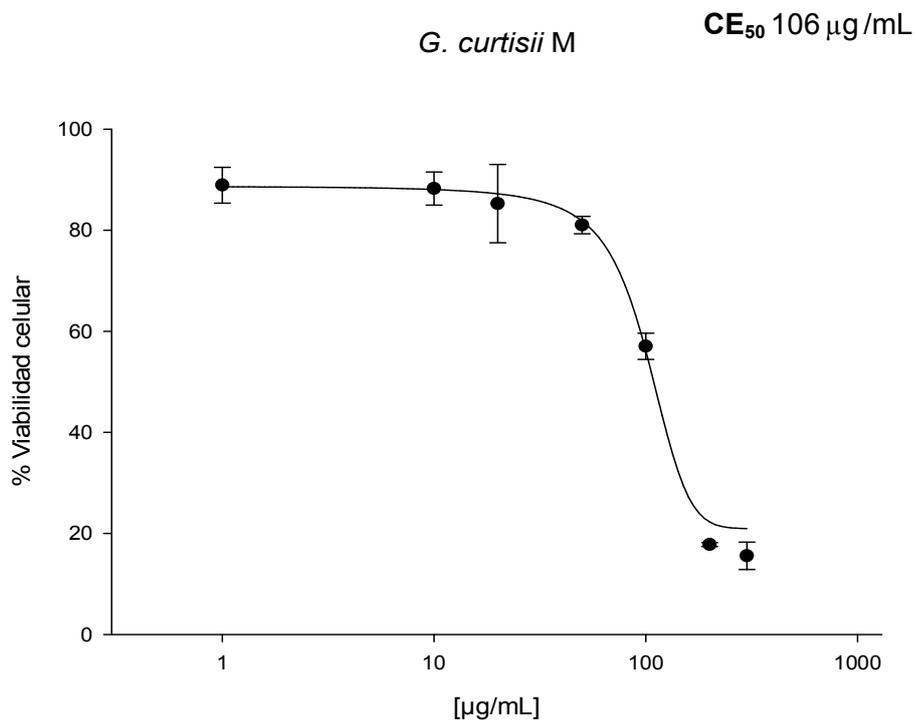
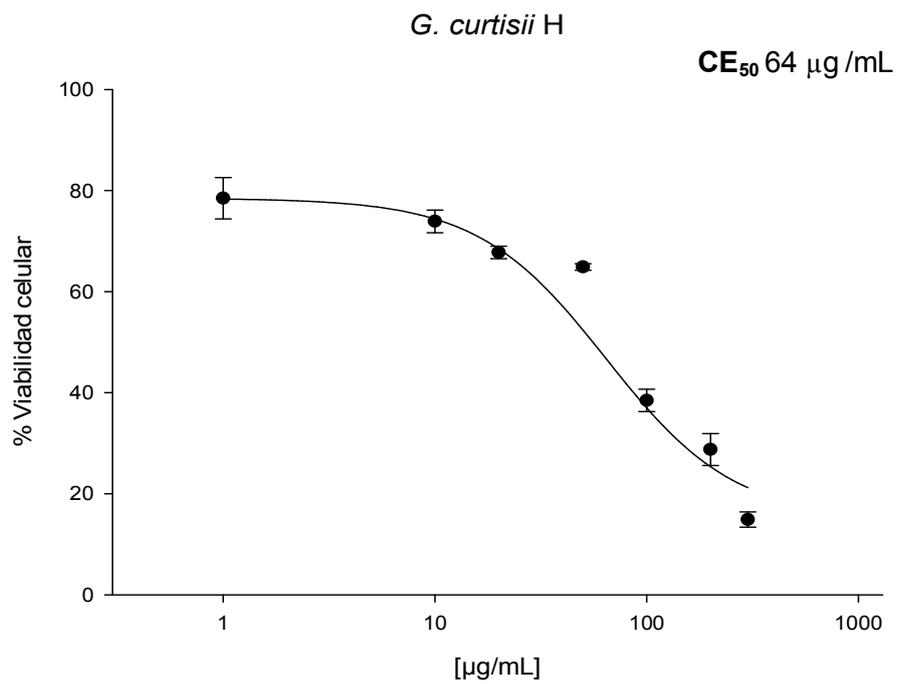


Figura 50. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de *G. curtisii* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células CHANG cultivadas durante 24 hr.

El análisis en conjunto de las curvas dosis efecto (DE) de los extractos evidencia que las fracciones hexánicas presentaron mayor citotoxicidad que las metanólicas frente a células CHANG, revelando una supervivencia similar en la dosis inicial (1 $\mu\text{g/mL}$) de 63% en *G. applanatum* y 70% en *G. curtisii*, con una CE_{50} de 63-64 $\mu\text{g/mL}$. En los extractos metanólicos el efecto citotóxico inicial fue menor, con un supervivencia del 88-89%. Sin embargo, *G. curtisii* tuvo una CE_{50} menor (106 $\mu\text{g/mL}$) que *G. applanatum* (Figura 51).

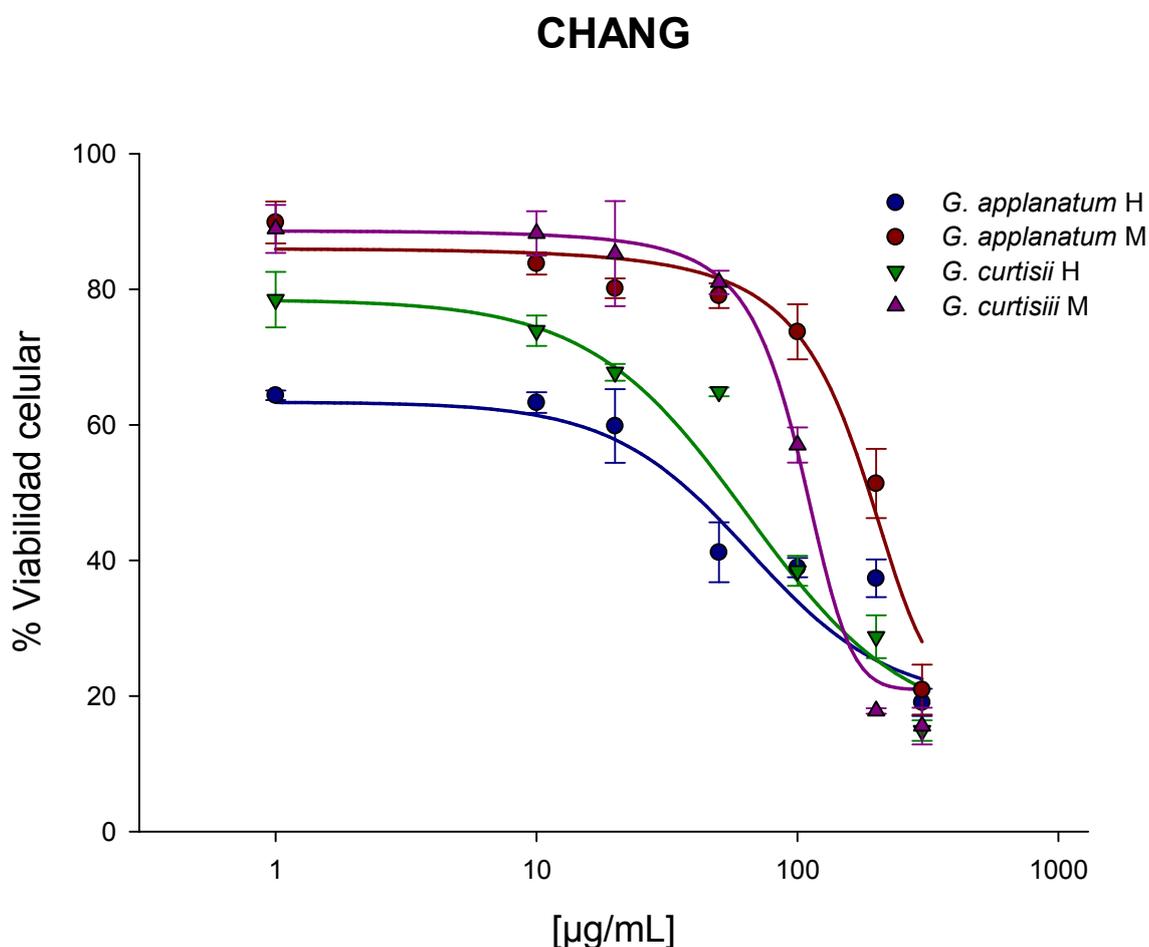


Figura 51. Comparación de las curvas dosis efecto (D-E) de los extractos de *G. applanatum* y *G. curtisii*, en concentraciones de 1 a 300 $\mu\text{g/mL}$ frente a células CHANG.

9.9.3 Línea celular MCF-7

Los resultados de la prueba de citotoxicidad con células MCF-7 (Figura 52) revelan para el extracto hexánico de *G. applanatum* un porcentaje de viabilidad de 75% en la concentración mínima (1 µg/mL), 18% en la máxima (300 µg/mL) y una CE₅₀ de 54 µg/mL. En tanto, el extracto metanólico tuvo una viabilidad de 98% en la concentración mínima, 28% en la máxima y una CE₅₀ de 186 µg/mL (Figura 53).

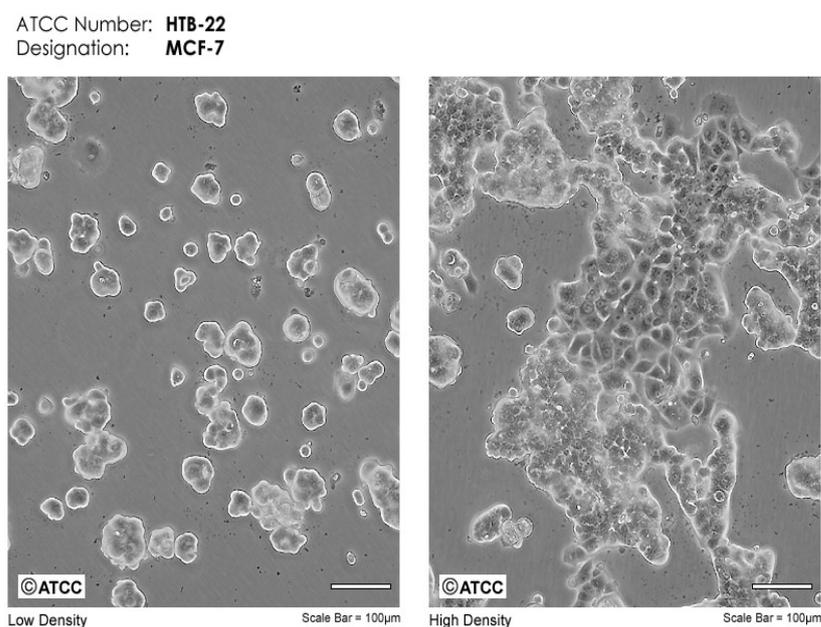


Figura 52. Morfología de la línea MCF-7 en cultivo (Tomado de ATCC).

En los extractos de *G. curtisii* la fracción hexánica mostró un porcentaje de viabilidad de 85% en la concentración mínima y 14% en la máxima con una CE₅₀ de 40 µg/mL, en cambio en la fracción metanólica el porcentaje de supervivencia en la dosis menor fue de 91% y con la máxima de 20%, con una CE₅₀ de 74 µg/mL (Figura 54).

5

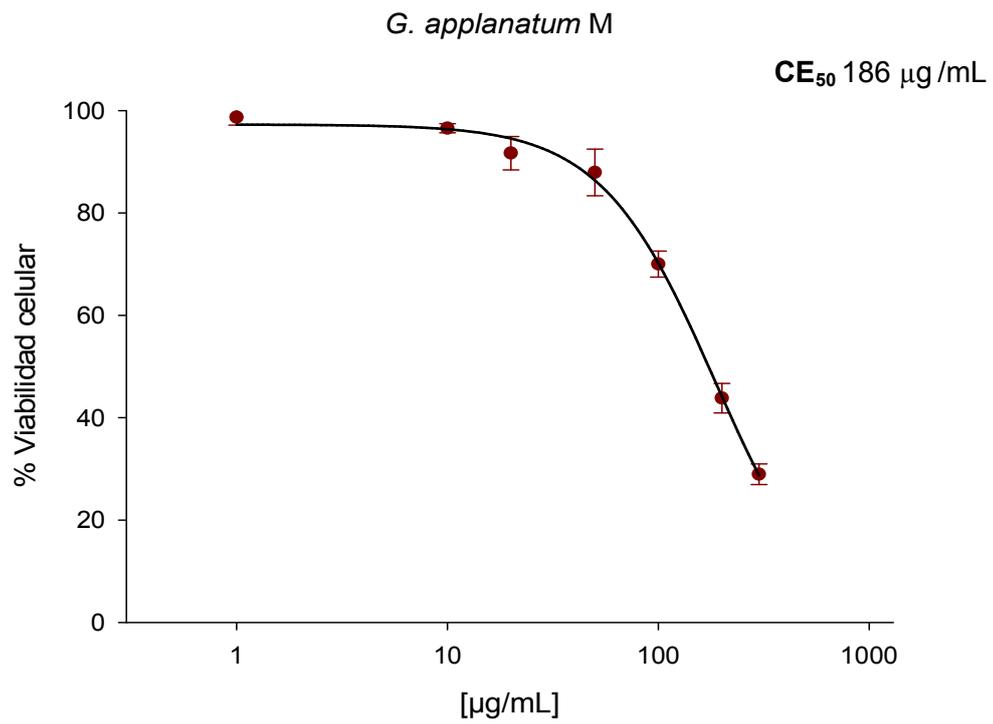
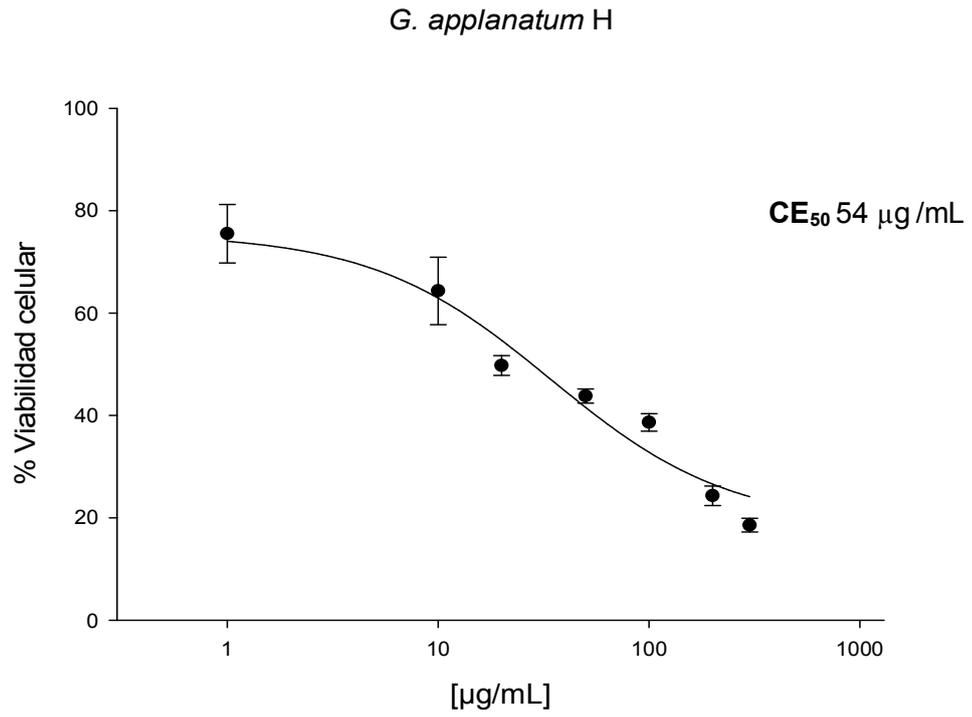


Figura 53. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de *G. applanatum* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MCF-7 cultivadas durante 24 hr.

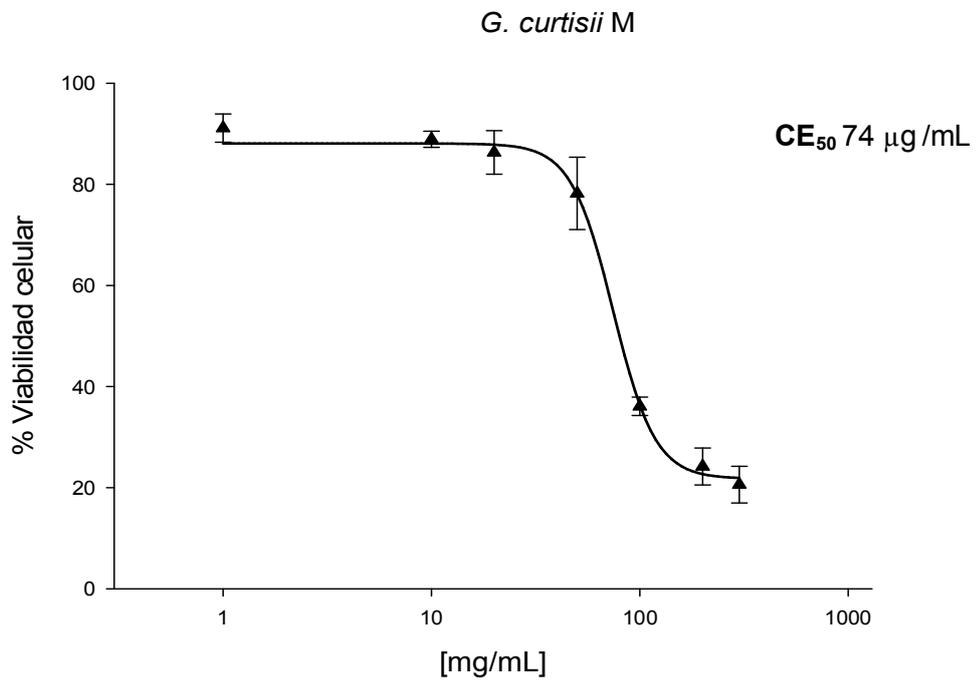
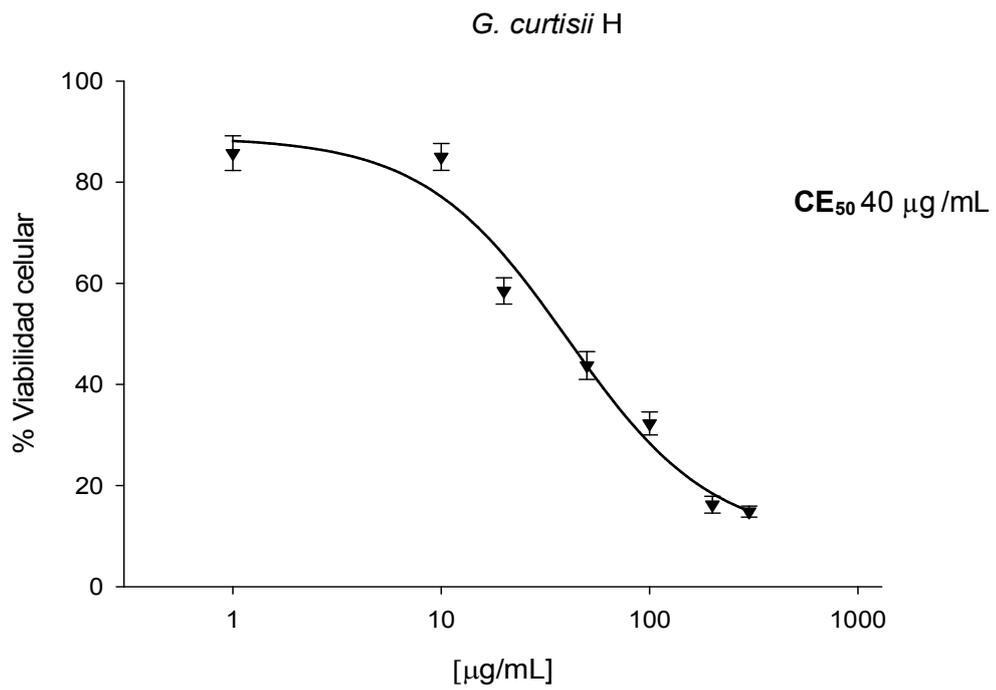


Figura 54. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos hexánico y metanólico de *G. applanatum* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MCF-7 cultivadas durante 24 hr.

La comparación de las curvas dosis efecto (DE) de los extractos permite apreciar un mayor efecto de las fracciones hexánicas para inhibir el desarrollo de las células MCF-7, mostrando una viabilidad inicial entre 75 y 85%, así como una baja CE_{50} de 54 y 40 $\mu\text{g/mL}$ para *G. applanatum* y *G. curtisii* respectivamente. Por otra parte, las fracciones metanólicas presentaron una mayor supervivencia celular entre 98 y 91% en la dosis más baja y de 28 a 20% en la máxima, que fue similar en ambas especies. Sin embargo, en *G. applanatum* la CE_{50} fue mayor (186 $\mu\text{g/mL}$) que en *G. curtisii* (74 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 55).

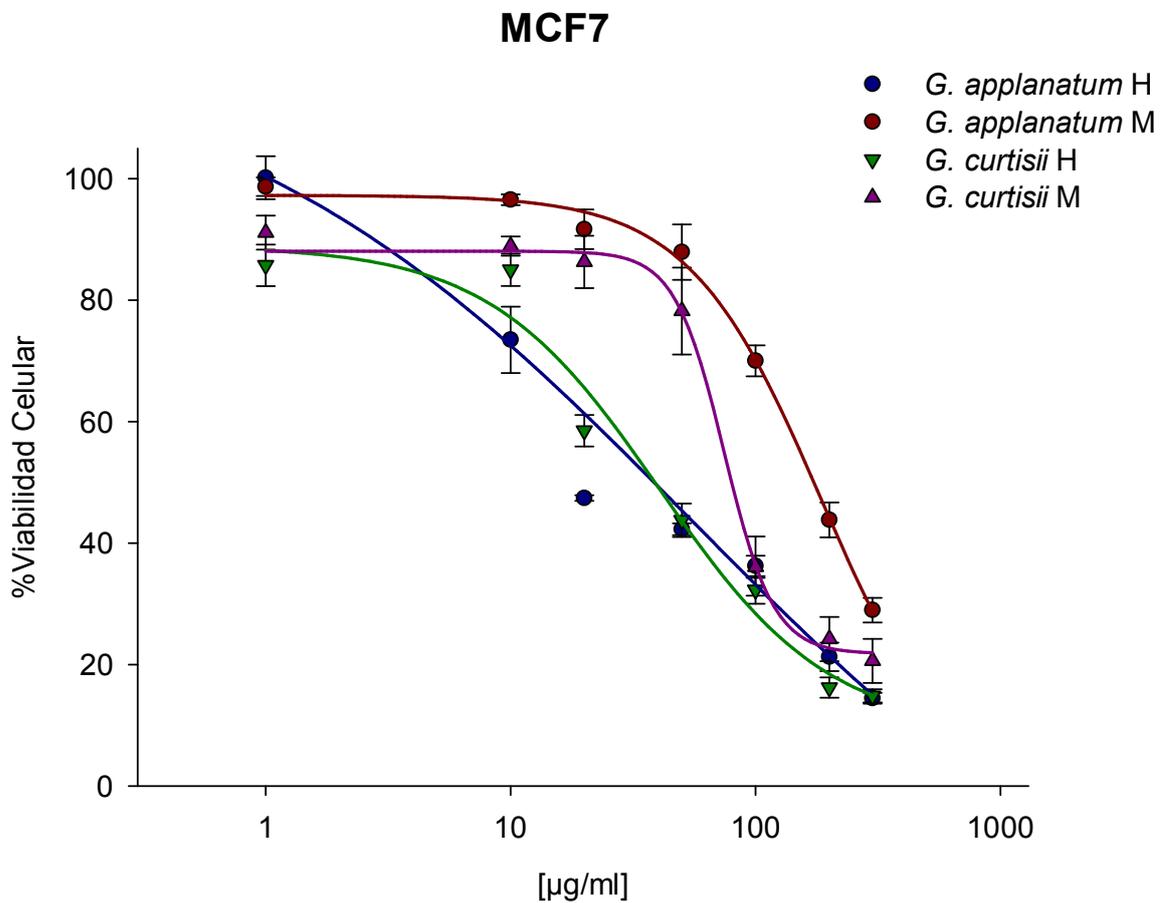


Figura 55. Comparación de las curvas dosis efecto (DE) de los extractos de *G. applanatum* y *G. curtisii* en concentraciones de 1 a 300 $\mu\text{g/mL}$ contra células MCF-7.

9.9.4 Línea celular MDA-MB231

Los ensayos con la línea MDA-MB231 (Figura 57) manifestaron en el extracto hexánico de *G. applanatum* una viabilidad que decreció de 75% en la concentración mínima a 19% en la máxima con una CE_{50} de 130 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo, en el extracto metanólico la supervivencia celular inició en 100% en la concentración mínima y disminuyó hasta 21% en la máxima, situando la CE_{50} en 180 $\mu\text{g/mL}$. (Figura 57).

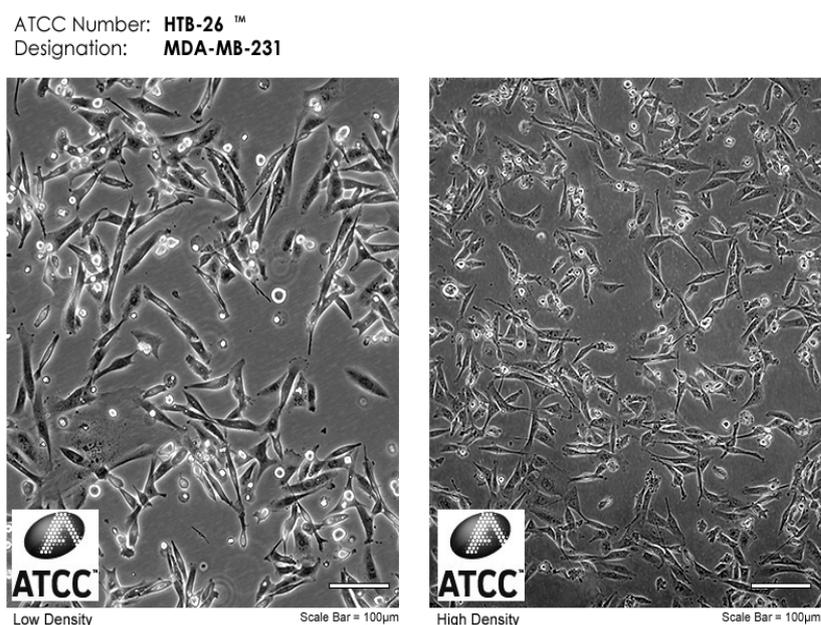


Figura 56. C Morfología de la línea MDA-MB231 en cultivo (Tomado de ATCC)

El extracto hexánico de *G. curtisii* redujo la viabilidad a 63 % en la concentración mínima y a 15% en la máxima, obteniendo una CE_{50} de 99 $\mu\text{g/mL}$. El extracto metanólico mantuvo el 99.5% de las células vivas en la concentración mas baja y disminuyó hasta 17% en la máxima, estimando la CE_{50} en 121 $\mu\text{g/mL}$. (Figura 58).

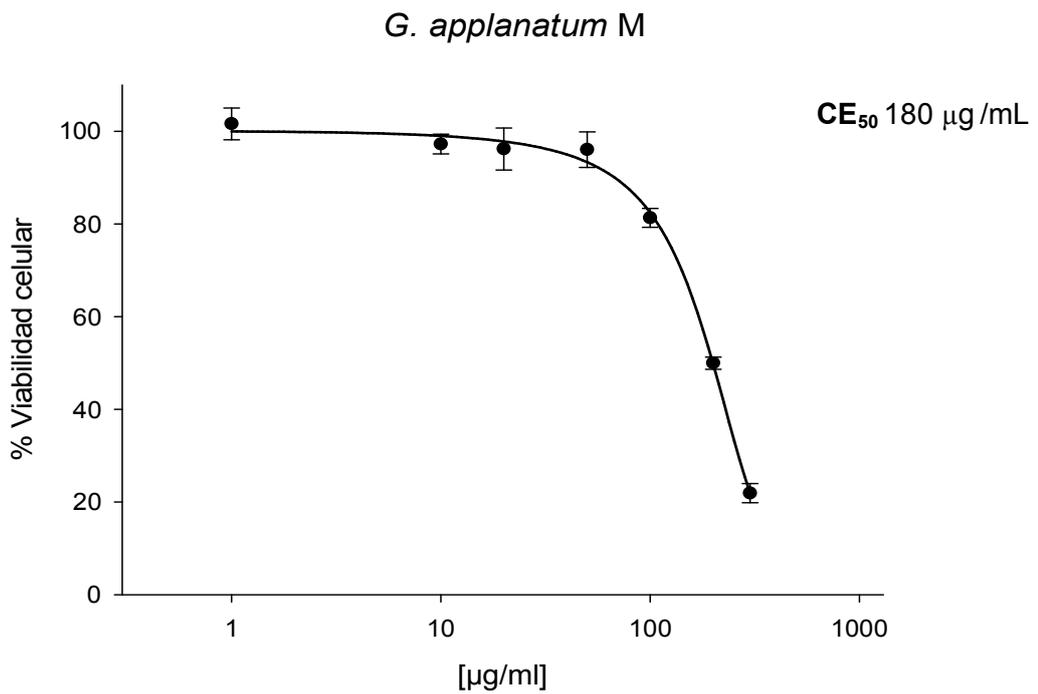
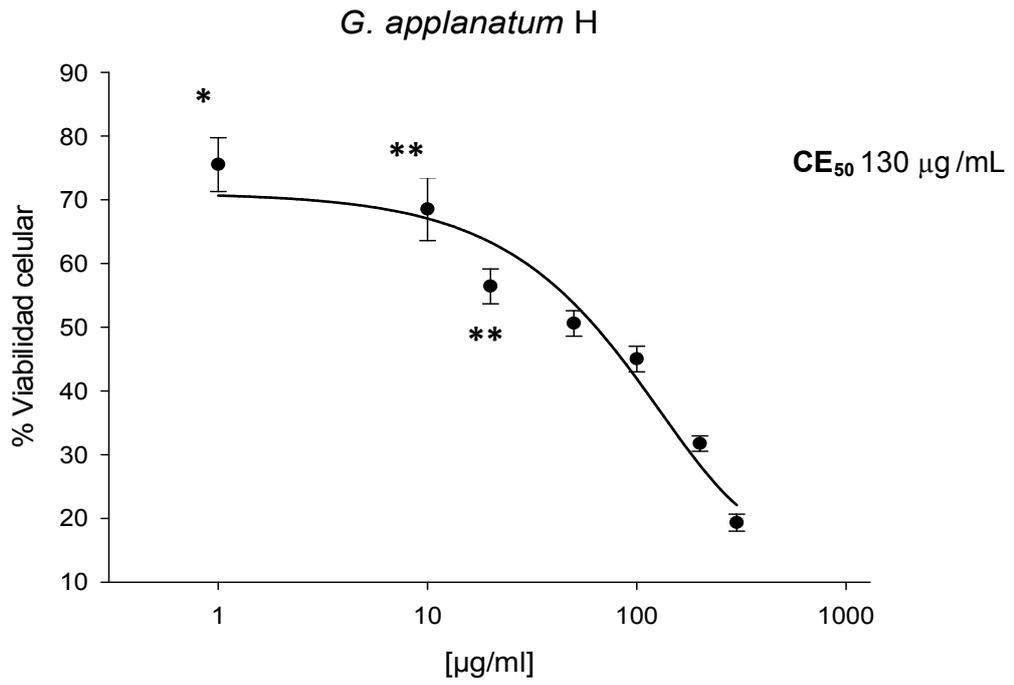


Figura 57. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos metanólicos y hexánicos de *G. applanatum* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231 cultivadas durante 24 hr.

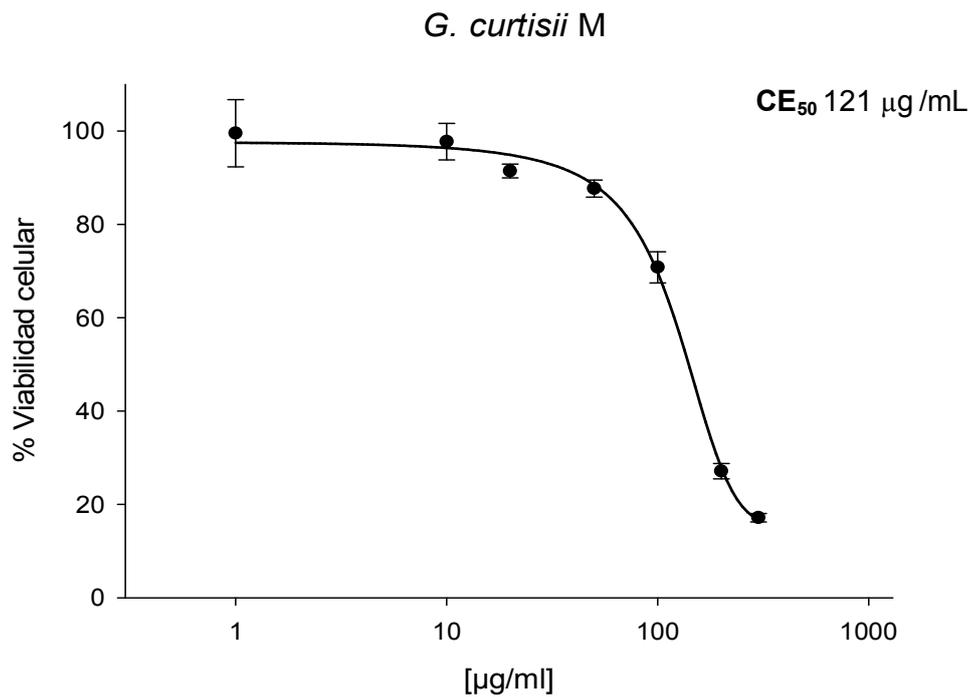
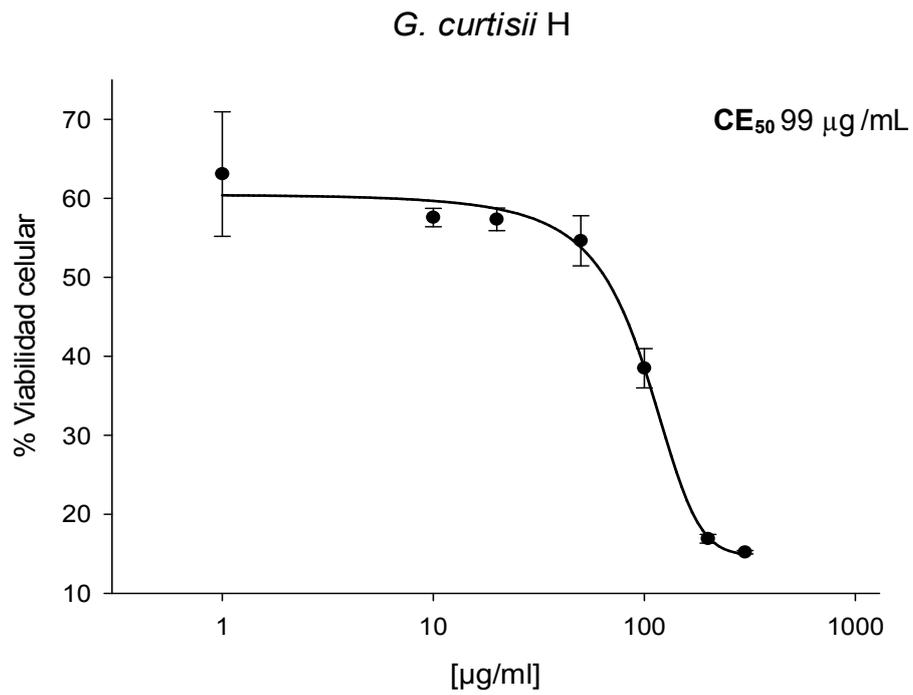


Figura 58. Curvas dosis efecto (DE) de los extractos metanólicos y hexánicos de *G. curtisii* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231 cultivadas durante 24 hr.

Al observar en conjunto las curvas dosis efecto (DE) de los cuatro extractos se aprecia mejor la mayor actividad citotóxica de las fracciones hexánicas ante células MDA-MB231 al producir una muerte celular del 37% en el caso de *G. curtisii* y 25% en *G. applanatum* a partir de la concentración mínima de 1 µg/mL llegando hasta el 85 y 81% en la dosis máxima, siendo las CE₅₀ de 99 y 130 µg/mL respectivamente. A diferencia de los metanólicos que inicialmente fueron menos tóxicos al permitir una supervivencia celular inicial del 100% en la concentración mas baja y final entre 17 y 21 % en la mas alta, aunque sus CE₅₀ fueron mayores, 121 µg/mL para *G. curtisii* y 180 µg/mL *G. applanatum* (Figura 59).

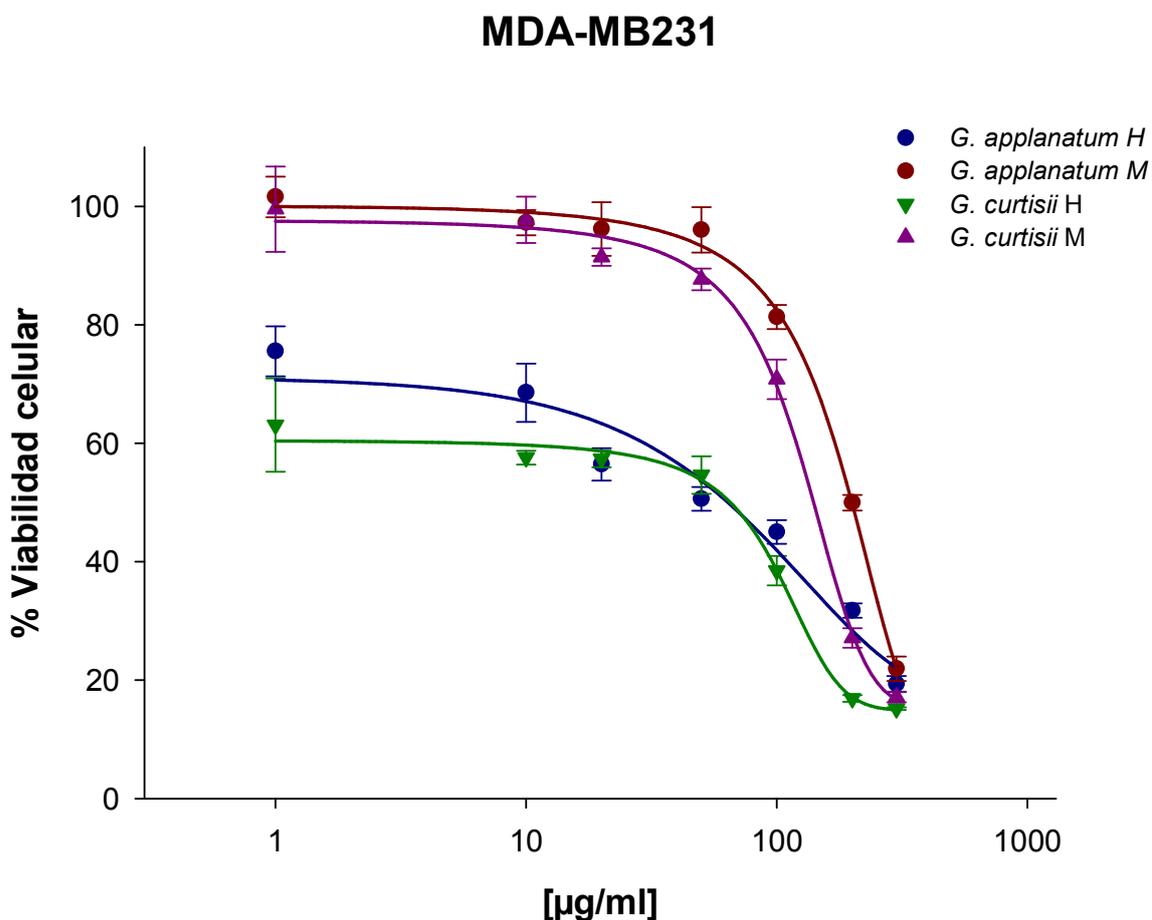


Figura 59. Comparación de las curvas dosis efecto (DE) de los extractos de *G. applanatum* y *G. curtisii* en concentraciones de 1 a 300 µg/mL contra células MDA-MB231.

Los resultados de las CE_{50} en las cuatro líneas celulares revelan que existe un buen efecto de los extractos hexánicos de *G. applanatum* y *G. curtisii* en las células de cáncer de mama poco invasivo (MCF-7) a dosis inferiores a de 40 a 54 $\mu\text{g/mL}$, pero no tan bajas contra cáncer de mama altamente invasivo (MDA-MB231). Sin embargo, se observó que afectaron también a las células sanas de control CHOK-1 y CHANG (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración efectiva 50 (CE_{50}) de los extractos de *G. curtisii* y *G. applanatum* contra las líneas celulares CHOK-1, MCF-7 y MDA-MB231.

ESPECIE	FRACCION	CHO-K1	CHANG	MCF-7	MDA-MB231
<i>G. applanatum</i>	Hexano	145±7	63±1	5±7	130±4
	Metanol	148±28	169±12	186±5	180±16
<i>G. curtisii</i>	Hexano	150±17	64±5	40.4±15	99±7
	Metanol	61±10	106±1	74±3	121±7

9.9.5 Ensayos con ergosterol

Los experimentos de citotoxicidad realizados con ergosterol a concentraciones de 1, 5, 10, 30, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$, revelaron una supervivencia en las células CHO-K1 de 83% en la concentración mínima que decreció hasta 3.5% en la máxima con una CE_{50} de 144 $\mu\text{g/mL}$, en la línea celular MCF-7 obtuvo un máximo de 79% de supervivencia celular a 1 $\mu\text{g/mL}$ de concentración, disminuyendo hasta 31% a 300 $\mu\text{g/mL}$, calculando su CE_{50} en 61 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que en las células CHANG, se mantuvo viable el 70.8% de las células en la concentración menor, misma que fué decayendo hasta el 13.8% en la concentración mayor, la CE_{50} calculada fue de 158 $\mu\text{g/mL}$. En último lugar, los resultados obtenidos con la línea celular MDA-MB231 indican una supervivencia celular del 63.2% a la concentración inicial y de 36.7% en la final, situando su CE_{50} en 47 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 60 y 61).

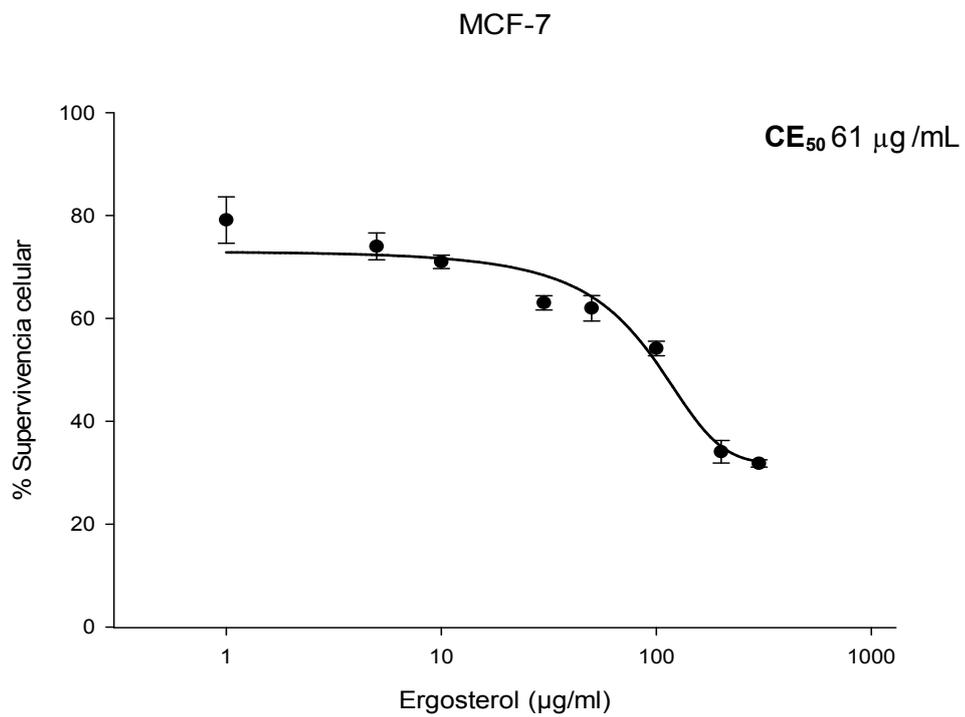
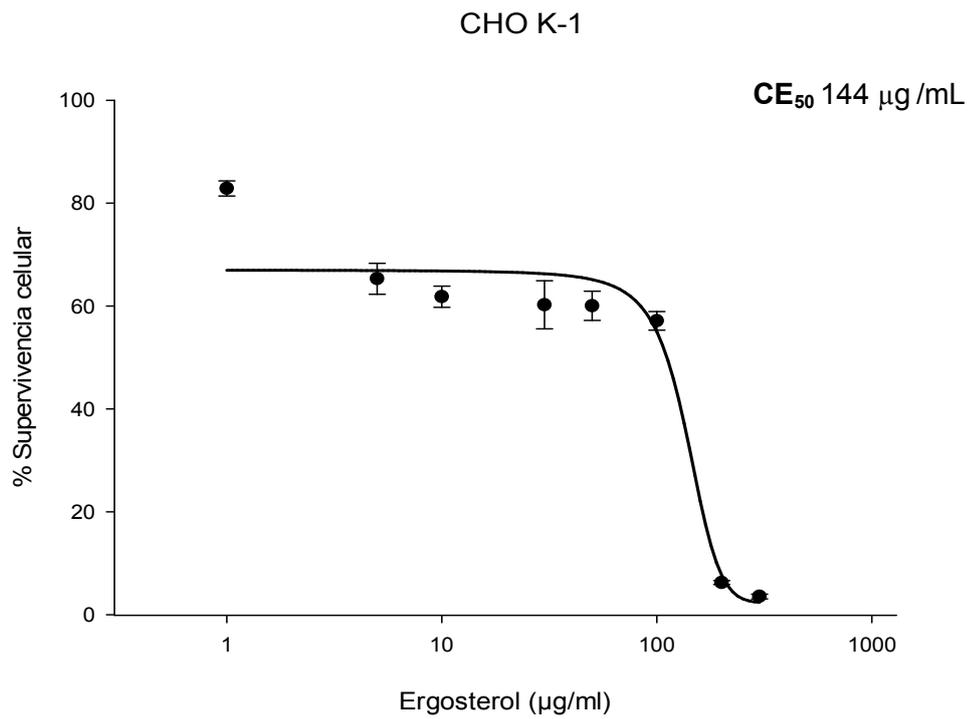


Figura 60. Curvas dosis efecto (DE) del ergosterol en concentraciones de 1 a 300 $\mu\text{g/mL}$ contra células CHO-K1 y MCF-7 cultivadas durante 24 hr.

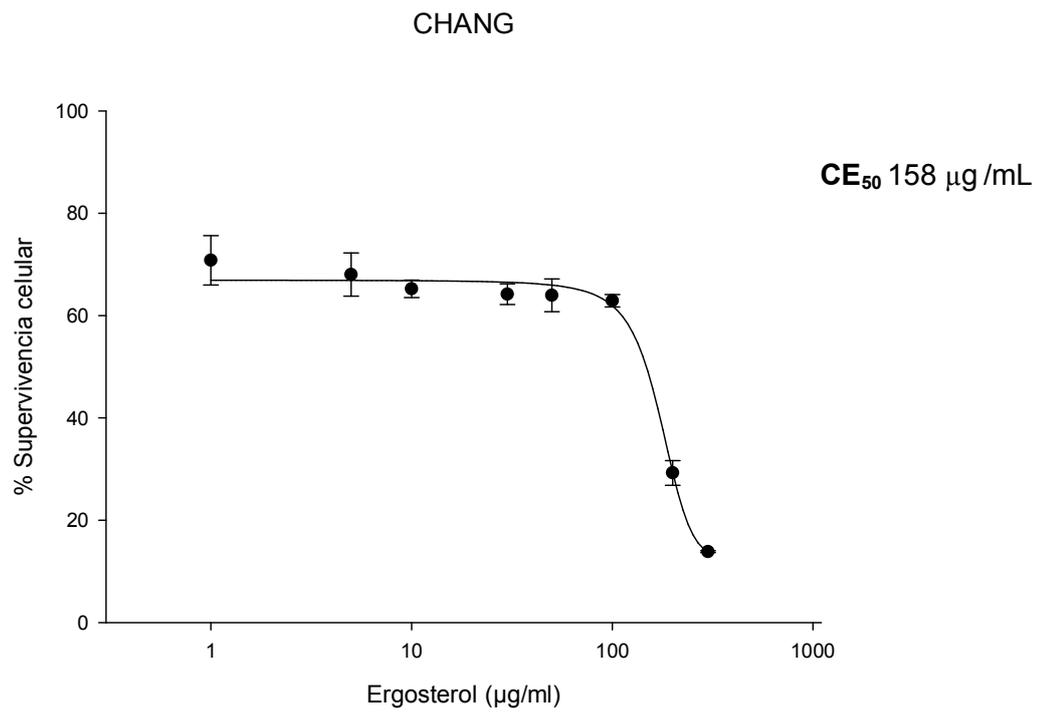
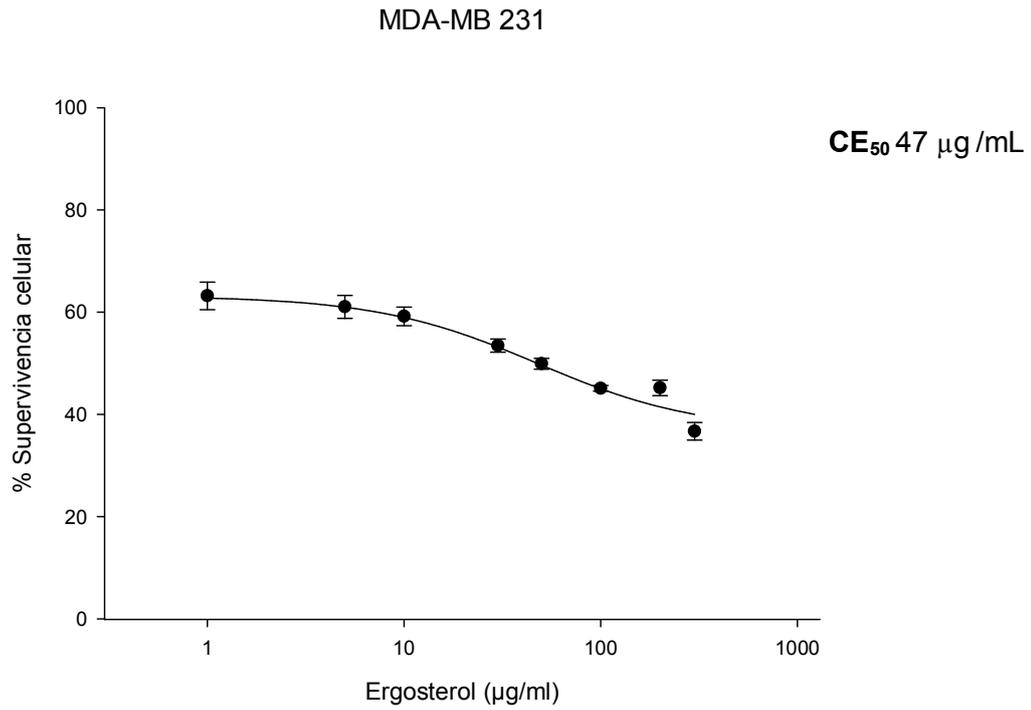


Figura 61. Curvas dosis efecto (DE) del ergosterol en concentraciones de 1 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra células MDA-MB231 y CHANG cultivadas durante 24 hr.

El análisis en conjunto permite apreciar un efecto similar del ergosterol para las células CHANG y CHOK-1 con una disminución gradual y progresiva de la viabilidad celular en concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con mayor efecto a partir de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, llegando a tasas de supervivencia de 13 y 3.5% respectivamente (Figuras 62 y 63). De igual manera se observa actividad intermedia con MCF-7 mostrando un rango de supervivencia celular de 79% a 31% y una CE_{50} de 61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figuras 62 y 64). La mayor actividad ocurrió con la línea MDA-MB231, al inducir una supervivencia inicial del 63% en la dosis menor, sin embargo alcanzó un máximo de 36.7% en la dosis mayor, obteniendo una CE_{50} calculada en 47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figuras 62 y 65).

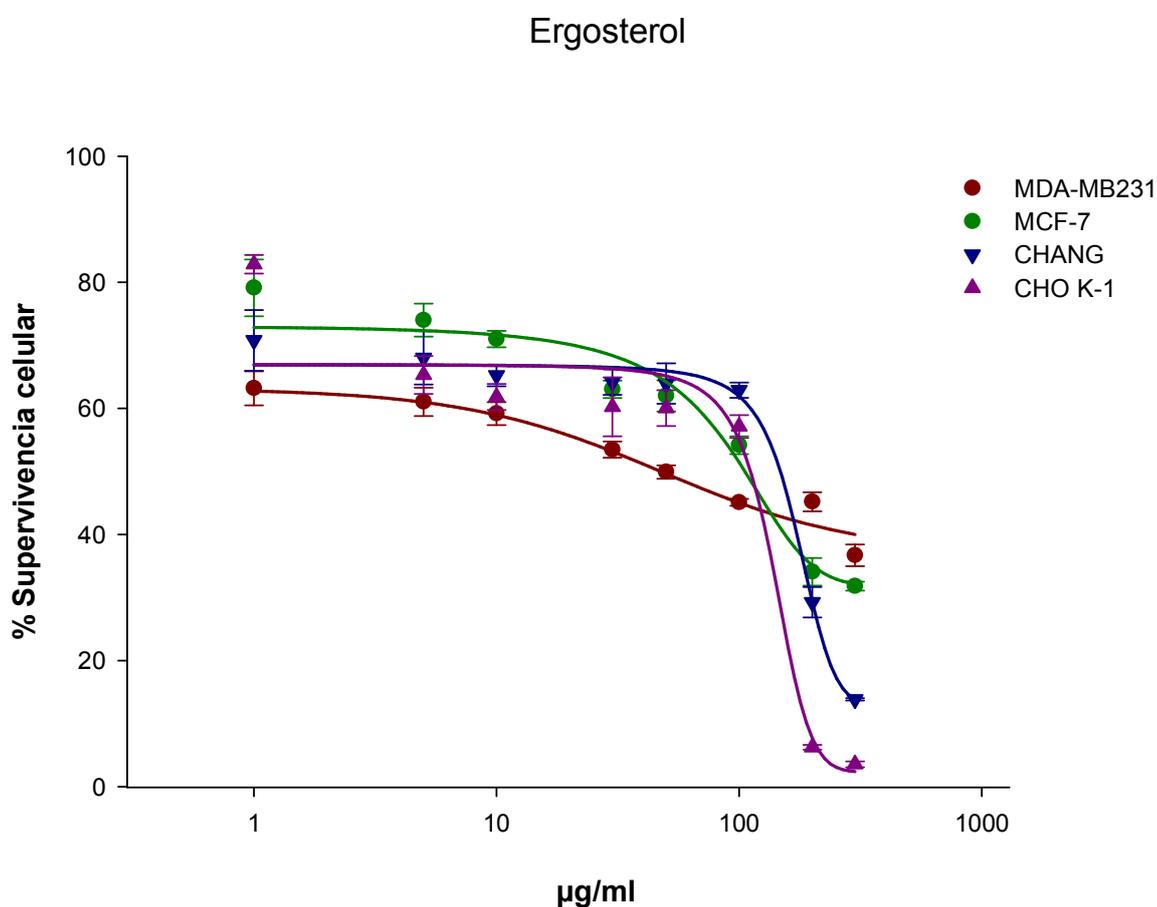


Figura 62. Comparación de curvas dosis efecto (DE) de ergosterol en concentraciones de 1 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra células MDA-MB231, MCF-7, CHANG y CHOK-1.

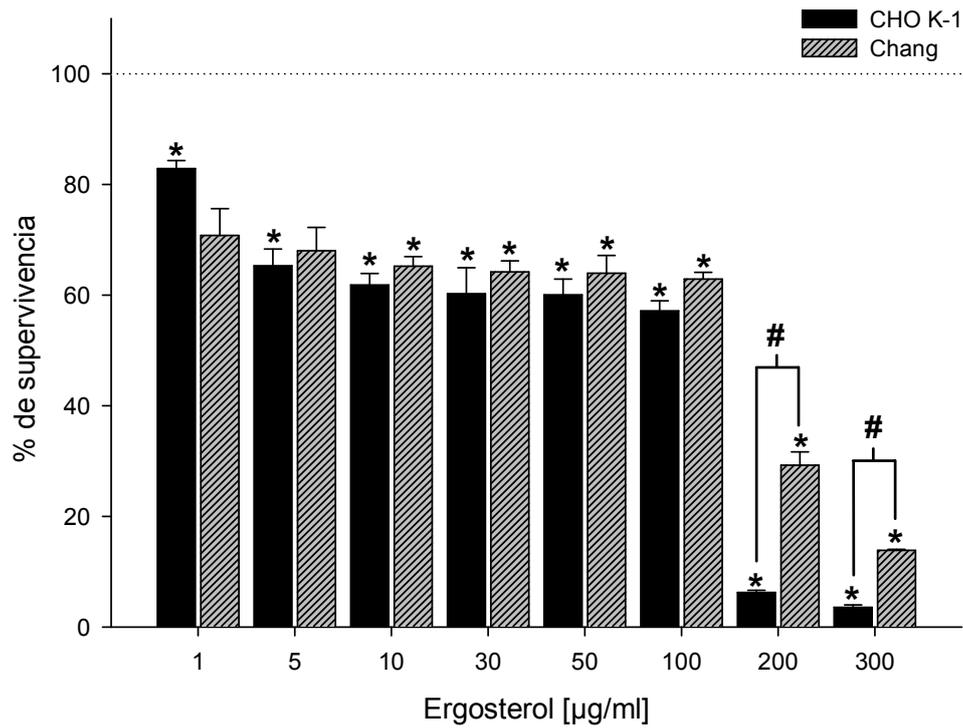


Figura 63. Comparación del porcentaje de supervivencia celular de las líneas CHOK-1 y CHANG en concentraciones de 1 a 300 µg/mL de ergosterol (*p < 0.05 vs ctrl y #p < 0.05).

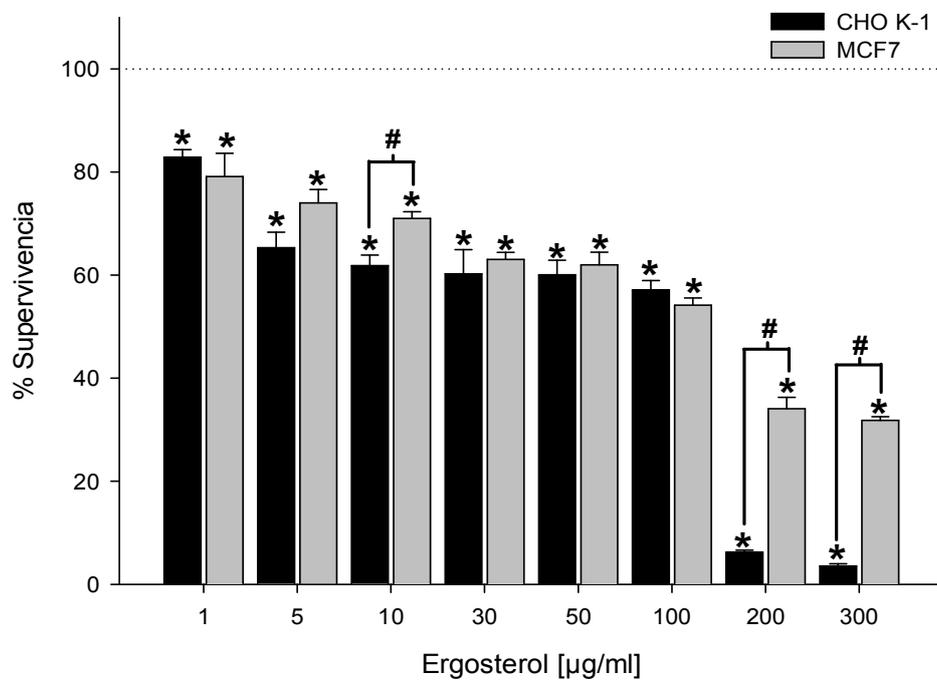


Figura 64. Comparación del porcentaje de supervivencia celular de las líneas CHOK-1 y MCF-7 en concentraciones de 1 a 300 µg/mL de ergosterol (*p < 0.05 vs ctrl y #p < 0.05).

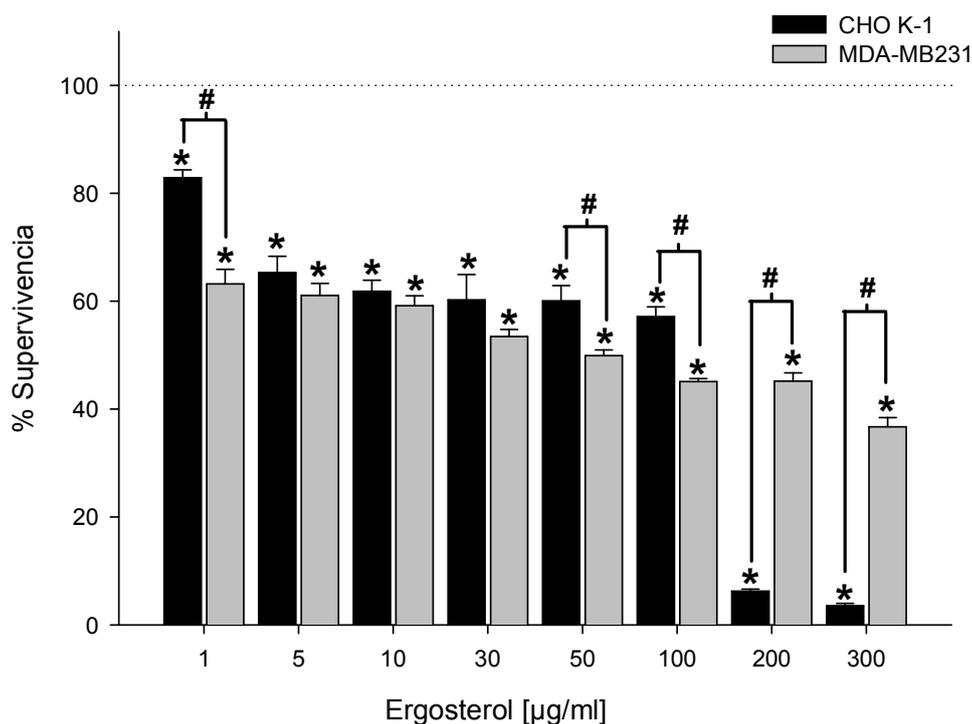


Figura 65. Comparación del porcentaje de supervivencia celular de las líneas CHOK-1 y MDA-MB231 en concentraciones de 1 a 300 µg/mL de ergosterol (*p < 0.05 vs ctrl y #p < 0.05).

10. DISCUSIONES

El análisis de la composición química de *G. applanatum*, *G. brownii* y *G. curtisii* indica que los compuestos esteroidales mayoritarios identificados concuerdan con lo reportado para el género *Ganoderma* en diferentes investigaciones (Lindequist, 1995; Paterson, 2006; Wiseman, 1993; Yazawa *et al.*, 2000; Trigos y Suárez-Medellín, 2011; Mizuno, 1997; Mendoza *et al.*, 2015).

El ergosterol (**1**) es un compuesto abundante en las especies fúngicas debido a que juega un papel importante en la fluidez, permeabilidad e integridad de la membrana celular, que regula los efectos de la unidad membrana-proteína asociada al transporte de nutrientes y la síntesis de quitina (Sturley, 2000). Se ha descrito en varias especies del género como *G. australe*, *G. applanatum*, *G. curtisii*, *G. lipsiense*, *G. lucidum*, *G. oerstedii* y *G. zonatum* (Ming *et al.*, 2002; Mendoza *et al.*, 2015; Paterson, 2006; Seo *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2013), determinó en todas las muestras analizadas, correspondiendo los desplazamientos y constantes de acoplamiento obtenidas mediante RMN con lo reportado por Seo *et al.* (2009) y Bordlagdan (2017). Así mismo, se ha reportado actividad biológica de interés como reducción de dolor por inflamación, reducción

de accidentes cardiovasculares, antioxidante, antiinflamatorio, antihiperlipidémico, precursor de la vitamina D, inhibición crecimiento tumoral en Sarcoma 180 e inhibición de angiogénesis (Wiseman, 1993; Bok *et al.*, 1999; Yazawa *et al.*, 2000; Takaku *et al.*, 2001; Subbiah y Abplanalp, 2003; Hu *et al.*, 2006).

Por otra parte, estelasterol o dihidroergosterol (**2**) es un compuesto esteroideo químicamente similar al ergosterol que resulta difícil separar por métodos habituales, se encontró en todas las muestras analizadas de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, lo cual corresponde con diferentes publicaciones que lo reportan en *G. australe*, *G. amboinense*, *G. applanatum*, *G. carnosum*, *G. concinnum*, *G. lucidum*, *G. mastoporum*, *G. neojaponicum*, *G. pfeifferi*, *G. tsugae* y *G. zonatum* (Gan *et al.*, 1998; González *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2002, Paterson, 2006; Seo *et al.*, 2009, Tonjock y Afui, 2011; Guzmán *et al.*, 2013; Thang *et al.*, 2013 y Suárez-Medellín *et al.*, 2014). Sin embargo no se encontraron investigaciones que reporten su aislamiento en *G. curtisii*. De igual modo, se ha experimentado su actividad antiinflamatoria, antiviral (herpes simple), inducción de apoptosis en cáncer de mama (MCF-7) y neuroblastoma (SH-SY5Y), inhibición del crecimiento celular en cáncer de hígado y carcinoma (KB) (Lin *et al.*, 1991; Niedermeyer *et al.*, 2005; Trigos, A. y Suárez-Medellín, 2011; Pereira *et al.*, 2014.)

El peróxido de ergosterol (**3**) es un producto de la oxidación del ergosterol por dos vías: foto-oxidación y termo-oxidación. Su espectro de RMN es muy parecido al de ergosterol, solamente difieren en los protones vinílicos del anillo B. En el presente trabajo se consiguió aislar únicamente de basidiomas silvestres de *G. curtisii*, aunque también se tienen reportes para *G. australe*, *G. applanatum*, *G. concinnum*, *G. mastoporum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum* (González *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2015), así mismo en *Pleurotus* sp. (Márquez-Fernández *et al.*, 2014). Se ha ensayado su actividad antitumoral, anticancerígena (inhibiendo el crecimiento celular de cáncer colorectal HT29), antimelanogénica, antiateroesclerosis y tripanocida (Kim *et al.*, 1999; Rösecke *et al.*, 2000; Takaku *et al.*, 2001; Kobori *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 2010; Trigos y Suárez-Medellín, 2011; Ramos-Ligonio *et al.*, 2012).

El esteroide **4** cetona 5 α -ergosta-7,22-dien-3-ona se obtuvo de basidiomas de *G. applanatum* y *G. brownii*, también de *G. curtisii* cultivado (basidioma y micelio) aunque en bajas concentraciones, éste compuesto se ha reportado para *G. australe*, *G. applanatum*, *G. concinnum*, *G. lucidum*, *G. mastoporum*, *G.*

neojaponicum, *G. oerstedii*, *G. pfeifferi* y *G. tsugae* (Gan *et al.*, 1998; González *et al.*, 2002; Paterson, 2006; Seo *et al.*, 2009, Tonjock y Afui, 2011; Guzmán *et al.*, 2013; Thang *et al.*, 2013 y Suárez-Medellin *et al.*, 2014), pero no se encontraron referencias para para *G. curtisii*. También posee actividad antioxidante, y proinflamatoria (Ko *et al.*, 2008; Thang *et al.*, 2013; Ramos-Ligonio *et al.*, 2017). Los cuatro esteroides presentan actividad antiinflamatoria, cardiovascular, antioxidante, antitumoral y anticancerígena, que le confieren un efecto medicinal (Mizuno *et al.*, 1995; Lindequist, 1995).

Entre los compuestos lipídicos, se aisló el ácido graso insaturado linoleico (ácido cis, cis-9,12-octadecadienoico) en basidiomas de *G. applanatum* y *G. brownii*, que diferentes autores identificaron también en *G. sinense*, *G. lucidum*, *G. applanatum* y *G. australe* como lo sustentan diferentes publicaciones (Martínez *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 2002; Lv *et al.*, 2012; Papaspyridi *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2016). Por otra parte, el ácido oleico (ácido cis-9- octadecanoico) se encontró en casi todas la muestras excepto *G. curtisii* cultivado (basidioma), éste ácido graso se ha reportado en *G. australe*, *G. applanatum*, así como en *Pleurotus ostreatus* y *P. cornucopiae* (Martínez *et al.*, 1991; Pedneault *et al.*, 2006, 2007 y 2008; Papaspyridi *et al.*, 2013).

Con relación a la actividad antioxidante, los extractos acuosos de *G. curtisii* (GcT, Gcmic y Gccul) mostraron mayor capacidad radicalaria en comparación con los extractos etanólicos, lo cual corresponde con lo reportado para *G. lucidum* y *G. tsugae* (Mau *et al.*, 2005_{a,b}). Sin embargo, difiere en *G. brownii* (GbT), *G. curtisii* (GcZ y GcA) y *G. applanatum* (Gapp), que mostraron mayor actividad en los extractos etanólicos con relación a los acuosos, similar a lo reportado para *G. applanatum*, *G. chaliceum* y *G. tsugae* (Singdevsachan *et al.*, 2017).

De manera general se observó que el contenido de polifenoles en las muestras analizadas de *Ganoderma*, fue mayor a lo reportado en extractos hidroalcoholicos de algunos hongos comestibles como *Agaricus bisporus* (19.97 mg EAG/g), *Pleurotus eryngii* (12.74 mgEAG/g), *Lentinula edodes* (10 mgEAG/g) y *Pleurotus ostreatus* (16.05 mgEAG /g) (Penzete *et al.*, 2012) y en extractos metanólicos de *Agaricus bisporus* variedad blanca y café (23.34 y 37.33 mgEAG/g), *Pleurotus ostreatus* (12.54 mgEAG/g), *Pleurotus eryngii* (7.14 mgEAG/g) y *Lentinula edodes* (8.84 mgEAG/g) (Reis *et al.*, 2012). Al analizar el

contenido de fenoles totales de los basidiomas de *G. curtisii* se mostraron similitudes entre cultivados (Gccul 38.57 mgEAG/g) y silvestres (GcZ y GcT), éstos valores corresponden con lo obtenido por Huerta *et al.* (2016) en extractos hidroalcohólicos y etanólicos de *G. curtisii* (35.63 mgEAG/g y 49.1 mgEAG/g) y por Čilerdžić *et al.*, (2014) en extractos etanólicos de *G. lucidum* (33.52 mgEAG/g). Para los basidiomas silvestres de *G. applanatum* se observó que el contenido de fenoles en extractos acuosos y etanólicos (61.36 y 58.79 mgEAG/g) es análogo a lo reportado por Kozarski *et al.* (2011) y Nagaraj *et al.* (2014), con valores entre 47 y 71 mgEAG/g respectivamente.

Al comparar el extracto acuoso del micelio de *G. curtisii*, se obtuvo que la concentración de 96.65 mgEAG/g, fue mayor a lo encontrado para micelio de *G. tsugae* (41.3 mg EAG/g) (Mau *et al.*, 2005_b), a diferencia del extracto etanólico que tuvo una concentración de 13.57 mg EAG/g, menor a lo reportado para el extracto metanólico de *G. tsugae* (35.6 mg EAG/g) (Mau *et al.*, 2005_a) y para extractos hidroalcohólicos de dos cepas de *G. lucidum* (Italia y China) con valores de 27.9 y 16.5 mg eq ácido cafeico/g respectivamente (Saltarelli *et al.*, 2009).

La actividad antioxidante se ha relacionado con la presencia de compuestos de bajo peso molecular (fenoles) responsables de capturar radicales libres (Gursoy *et al.*, 2009), aunque también contribuyen los triterpenos (Smina *et al.*, 2011) y los polisacáridos de alto peso molecular, como se demostró en pruebas con *G. tsugae* (Tseng *et al.*, 2008) y *G. curtisii* (Saltarelli *et al.*, 2009), éstos compuestos además poseen propiedades reguladoras del sistema inmune, anti-radiación, anti-coagulantes, anti-cáncer, anti-HIV e hipoglicémicas (Lee *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2003). De igual forma se conoce que los micoesteroles como el ergosterol y sus derivados, contribuyen a la peroxidación lipídica (Kozarski *et al.*, 2011)

Las diferencias en cuanto a la actividad antioxidante y concentración de fenoles totales en las muestras analizadas indicarían que la concentración de metabolitos secundarios (polisacáridos, triterpenos, fenoles y esteroides) varían dependiendo de la especie, etapa de desarrollo y sustrato en que se desarrollan, además del método de extracción, la polaridad de los disolventes y temperatura empleados (Nishitoba *et al.*, 1986; Kalac y Svodoba, 2000). Si bien, algunos autores indican una correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales, en éste trabajo no se obtuvo correlación. Las propiedades

antioxidantes de los polifenoles se deben principalmente a su capacidad para quelar metales, inhibir la lipooxigenasa y capturar radicales libres, aunque también se conoce que la reacción antioxidante en la prueba de Folin puede incrementarse por la acción de otros compuestos no polifenólicos como aminoácidos, azúcares, vitaminas, y carotenoides (Decker, 1997).

Los resultados obtenidos en células MCF-7 indican que los extractos hexánicos de *G. curtisii* y *G. applanatum* (CE₅₀ de 40.4 y 54 µg/mL respectivamente) tuvieron mayor efecto que los metanólicos (CE₅₀ 74 y 186 µg/mL), estos valores son similares a los obtenidos por Jiang *et al.* (2006) en extractos acuosos de *G. lucidum* a una concentración de 31 µg/mL (47% de viabilidad celular en 24 h de cultivo y 61% en 48 h) y son menores a lo reportado por Smina *et al.* (2011) en la fracción cloroformica de *G. lucidum* (100 µg/mL), por Hu *et al.* (2002) para extractos etanólicos de *G. lucidum* (500 µg/mL), por Stojkovic *et al.* (2013) para extractos metanólicos (309.6 µg/mL) y por Yue *et al.* (2006) con extractos acuosos de *G. tsugae* (CE₅₀ 332 µg/mL), *G. lucidum* (CE₅₀ 359 µg/mL) y *G. sinense* (CE₅₀ 406 µg/mL).

En células MDA-MB231 igualmente se observó diferencia entre extractos hexánicos y metanólicos de *G. applanatum* (CE₅₀ 130 y 180 µg/mL) y *G. curtisii* (CE₅₀ 99 y 121 µg/mL respectivamente). El valor obtenido en el extracto metanólico de *G. applanatum* es mayor al reportado por Hakkim *et al.* (2016) para *G. applanatum* de 84.6 µg/mL en 24 h de cultivo, por Jiang *et al.* (2006) en *G. lucidum* de 125 µg/mL con 50% de viabilidad en 24 h y 60% en 48 h, pero menor al obtenido por Yue *et al.* (2006) en extractos acuosos de *G. tsugae* (CE₅₀ 214 µg/mL), *G. lucidum* (CE₅₀ 257 µg/mL) y *G. sinense* (CE₅₀ 301-326 µg/mL).

Los resultados parecen confirmar que la línea celular de cáncer de mama estrógeno-dependiente (MCF-7) es más sensible que la estrógeno-independiente (MDA-MB231) (Jiang *et al.*, 2006) a los extractos hexánicos, mostrando *G. curtisii* un mayor efecto citotóxico que *G. applanatum*.

En las células CHANG los extractos hexánicos de *G. curtisii* y *G. applanatum* tuvieron un efecto análogo (CE₅₀ 64-63 µg/mL) siendo más efectivos que los metanólicos (CE₅₀ 106-169 µg/mL), menores a lo referido por Stojkovic *et al.* (2013) para células HeLa (311 µg/mL) y células HEPG-2 (hepatocarcinoma) >400 µg/mL en extractos metanólicos de *G. lucidum*. Sin embargo, la CE₅₀ fue

mayor que en la línea HEP-2 (hibridoma de células faríngeas con HeLa) de 43.2 µg/mL al probar extractos metanólicos de *G. applanatum* (Hakkim *et al.*, 2016).

Para las células control CHOK-1 los valores CE₅₀ fueron mayores a los obtenidos en MCF-7 y CHANG, para ambos extractos de *G. applanatum* y solamente para el hexánico de *G. curtisii*, no obstante en MDA-MB231 fueron igualmente altos lo que pudiera deberse a la resistencia y capacidad de invasiva de ésta línea celular.

En otras investigaciones realizadas con extractos metanol-agua de *G. lucidum*, se ha comparado la actividad citotóxica con diferentes leucemias obteniendo resultados prometedores: HL-60 (CE₅₀ 26 µg/ml), U937 (CE₅₀ 63 µg/ml), K562 (CE₅₀ 50 µg/ml), Blin-1 (CE₅₀ 38 µg/ml), Nalm-6 (CE₅₀ 30 µg/ml) y mieloma PMI8226 (CE₅₀ 40 µg/ml). (Müller *et al.*, 2006), que pudieran deberse a la acción sinérgica de los compuestos.

Como apoyo a los resultados de las pruebas de citotoxicidad, se conoce que los compuestos mayoritarios aislados de los extractos hexánicos: ergosterol (1), estelasterol (2) y peróxido de ergosterol (3), han mostrado actividad con diferentes líneas de cáncer.

Los experimentos realizados para evaluar el ergosterol contra MCF-7 dieron por resultado una CE₅₀ de 61 µg/mL en 48 hr de cultivo, mayor a la obtenida por Li *et al.* (2015) de 20 y 40 µg/mL en cultivos de 24 y 48 h. Por otra parte con la línea MDA-MB231 se obtuvo una CE₅₀ de 47 µg/mL, similar a los resultados de Li *et al.* (2015) para el cultivo de 24 h, pero mayor al de 48 h (49.58 y 24.9 µg/mL respectivamente) y al obtenido por Ma *et al.* (2013) de 39.6 µg/mL (100 µM/mL). Mientras que en células CHANG el valor CE₅₀ (150 µg/mL) fue comparable al de CHOK-1 (144 µg/mL), pero mayor al de HEP-2 (hibridoma de epitelio de faringe y HeLa) 40 µM/mL (15.84. µg/mL)(Sankaran *et al.*, 2017).

De igual forma existen trabajos que describen el efecto citotóxico del peróxido de ergosterol con la línea MDA-MB231 con una CE₅₀ de 30 µM (11.88 µg/mL) (Ma *et al.*, 2013), además de líneas de cáncer de estómago (SNU-1), hígado (SNU-354), colorectal (SNU-354) y sarcoma 180 murino (CE₅₀ 18.7, 158.2, 84.6 y 74.1 µM, respectivamente) por Nam *et al.* (2001). También se ha comprobado la capacidad del estelasterol para interrumpir la fase G₀ y G₁ en neuroblastoma (SH-SY5Y) a una concentración de 66 µg/mL (Pereira *et al.*, 2014).

Mientras que la actividad de los extractos metanólicos puede atribuirse a la presencia de polisacáridos que actúan de manera sinérgica a través de diferentes respuestas inmunes como la activación de macrófagos, células NK y células T, el incremento en la producción de anticuerpos, interleucinas e interferón, promoviendo la apoptosis de células cancerosas (Liang *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2012; Wasser, 2002; Maji *et al.*, 2013), algunos glucanos aislados de *G. lucidum* han mostrado actividad ante células HeLa y HepG2 (Wiater *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

11. CONCLUSIONES

En los extractos analizados de *Ganoderma curtisii* se lograron determinar los esteroides mayoritarios 1–3 y en *G. applanatum* adicionalmente el esteroide 4, estos micosteroides no son nuevos, se han identificado en diferentes especies del complejo *Ganoderma* y poseen importante actividad antioxidante, anticancerígena, antitumoral y antiinflamatoria, de igual forma se identificaron dos ácidos grasos: oleico y linoleico. El estudio químico del complejo *Ganoderma* es incipiente en México, por lo que es preciso continuar la investigación en este campo, debido a su importancia comercial y potencial uso medicinal. Estos productos naturales pueden ser marcadores quimiotaxonómicos, por lo que su determinación y cuantificación contribuirían en la identificación de especies.

Por otra parte, la actividad antioxidante determinada en el presente trabajo indica que las muestras analizadas de las tres especies tienen importante actividad radicalaria que varía en función del disolvente empleado para la extracción, de la especie de que se trate, además del estado de maduración (micelio o basidioma), sustrato y origen (silvestre o cultivado), del mismo modo el contenido de polifenoles fue mayor a lo que se tiene reportado en diferentes especies fúngicas inclusive del mismo género, no observándose una correlación entre la cantidad de polifenoles y la capacidad radicalaria. Con el análisis discriminante generalizado AFDG se pudo comprobar que existe un efecto significativo ($P < 0.0001$) del factor solvente y de sus interacciones con la localidad y las diferentes especies de *Ganoderma* en el contenido de fenoles totales y antioxidantes.

En cuanto a la actividad citotóxica se observó mayor efecto inhibitorio en los extractos hexánicos, lo cual se puede justificar por la presencia de los compuestos esteroideos: ergosterol, estelasterol, peróxido de ergosteol y ergosta 7-22-dien3 ona, tal es el caso del ergosterol que de manera individual tuvo un mayor efecto en las células MDA-MB231 y MCF-7 en comparación con las demás. El extracto hexánico de *G. applanatum* mostró ser mas potente sobre la línea celular MC-7 con una CE_{50} de 54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que su mayor eficacia se observo sobre la línea Chang-HeLa al inhibir la supervivencia de la línea alrededor de 68%. Mientras que el extracto hexánico de *G.curtisii* fue más potente sobre la línea MCF-7 con un EC_{50} de 40.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y más eficaz sobre la línea MDA-MB231 inhibiendo la supervivencia de la línea un 68.5% en la EC_{50} (99 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados parecen confirmar que el extracto hexánico de *G. curtisii* es mas eficaz, al mostrar un efecto citotóxico ante la línea celular de cáncer de mama estrógeno-dependiente (MCF-7) que resultó ser mas sensible que la estrógeno-independiente (MDA-MB231), al tener una dosis efectiva 50 inferior a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque *G. applanatum* se posicionó ligeramente por encima de éste valor (54. $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En los extractos metanólicos *G. applanatum* mostró ser mas potente sobre la línea celular CHOK-1 con una EC_{50} de 149 mg/mL , mientras que su mayor eficacia se observó sobre la línea Chang-HeLa al inhibir la supervivencia de la línea alrededor de 55%, por otra parte, el extracto hexánico de *G.curtisii* fue más potente y eficaz sobre la línea MCF-7 con un EC_{50} de 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibiendo la supervivencia un 54.5%.

Ambos extractos disminuyeron la supervivencia celular de la línea CHANG (Chang- HeLa), en dosis cercanas a los 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo las células MDA-MB231 y CHOK-1 requirieron dosis altas para verse afectadas, lo que nos pudiera indicar cierta selectividad de los compuestos que conforman los extractos hexánicos y que pudieran estar actuando de manera sinérgica Por lo que se podría continuar la investigación con ensayos que permitan evaluar su capacidad para inhibir la metástasis como son las pruebas de migración celular y ensayo de herida, además de la evaluación de los mecanismos de acción que interfieran en la inhibición y síntesis de proteínas y enzimas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adaskaveg J.E. y R.L. Gilbertson. 1988. Basidiospores, pilocystidia and other basidiocarp characters in several species of *Ganoderma lucidum* complex. *Mycologia*, 80(4):493–507.
2. Alvarado-Rosales D., Saavedra-Romero L., Almaraz-Sánchez A., Tlapal-Bolaños B., Trejo-Ramírez O., Davidson J.M., Kliejunas J.T., Oak S., O'Brien J.G., Orozco-Torres F. y D. Quiroz-Reygadas. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos en México. *Polibotánica*, 23:1–21.
3. Acharya K., Yonzone P., Rai M. y R. Acharya. 2005. Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Ganoderma applanatum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43: 926-929
4. Ariffin D., Idris A.S. y G. Singh. 2000. Status of *Ganoderma* in oil palm. In: *Ganoderma* diseases of perennial crops (Ed. J. Flood, P.D. Bridge, M. Holdernes). CABI Publishing. London U.K. 3:49–68.
5. Baby S., Johnson A.J. y Govindan B. 2015. Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, 114:66–101.
6. Bandala V.M., Guzmán G. y L. Montoya. 1993. Los hongos del grupo de los Poliporáceos conocidos en México. *Revista forestal*, 13:1–55.
7. Berovic M., Habijanac J., Zore I., Wraber B., Hodzar D., Boh B. y F. Pohleven. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 103:77–86.
8. Bok J.W., Lermer L., Chilton J., Klingeman H.G. y G.H Towers. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51(7):891–898.
9. Bordlagdan M.S., De Castro M.E.G, Van Altena I.A. y C.Y. Ragasa. 2017. Sterols from *Trametes versicolor*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8(2):740–744.
10. Cao L.Z. y Z.B. Lin. 2003. Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(4):312–326.
11. Chen C.S. 1993. Methods for inducing various morphological fruiting body of *Ganoderma tsugae* (Murr.). *Transactions of the Mycological Society of the Republic of China*, 8: 9-16.
12. Chen J.K. y T. Chen. 2004. *Chinese Medical Herbology and Pharmacology*. Art of Medicine Press, City of Industry, California USA. 14:770–771.

13. Chen Y., Xie M.Y., Nie S.P., Li C. y Y.X. Wang. 2008. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry*, 107(1): 231-241.
14. Chuang C.M., Wang H.E., Chang C.H., Peng C.C., Ker Y.B., Lai J.E., Chen K.C. y R.Y. Peng. 2013. Sacchachitin, a novel chitin-polysaccharide conjugate macromolecule present in *Ganoderma lucidum*: Purification, composition, and properties. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, 51(1):84–95.
15. Chung W.T., Lee S.H. y J.D. 2001. Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92:550–555.
16. Ćilerdžić J., Vukojević J., Stajić M., Stanojković T. y J. Glamočlija. 2014. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology*, 155:312–319.
17. Cibrián-Tovar D., Alvarado-Rosales D. y S.E. García-Díaz (Eds.). 2007. Enfermedades forestales en México. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. 587 p.
18. Cole R.J. y M.A. Schweikert. 2003. Handbook of secondary fungal metabolites. Academic Press, San Diego, Ca, USA. 2498 p.
19. Crespo A. y H.T. Lumbsch. 2010 Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus*; 1(2): 167–170.
20. Decker E.A. 1997 Phenolics: prooxidants or antioxidants. *Nutrition Reviews*, 55:396–407.
21. El-Mekkawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N., Shimotohno K., Kawahata T. y T. Otake. 1998. Anti HIV-1 and anti HIV-1 protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 49:1651–1657.
22. Ekindjo L.K. y P.M. Chimwamurombe. 2012. Traditional medicinal uses and natural hosts of the genus *Ganoderma* in north–eastern parts of Namibia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6(3):1139–1146.
23. Fang Q.H. y J.J. Zhong. 2002. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 18:51–54.
24. Ferreira I., Vaz, J., Vasconcelos M. y A. Martins. 2010. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-cancer agents in medicinal Chemistry*, 10(5): 424–436.
25. Gaitán-Hernández R., D. Salmenes, R. Pérez y G. Mata. 2002. Manual práctico del cultivo de setas: Aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología A.C. Xalapa, México. 56 p.

26. Gan K.H., Fann Y.F., Hsu S.H., Kuo K.W. y C.N. Lin. 1998. Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of Natural Products*, 61:485–487.
27. García E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. 2ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía. 246 p.
28. Garza L., Ramírez X.S., Garza F., Salinas M.C., Waksman N., Alcaráz Y. y O. Torres. 2006. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. *Ciencias Universidad Autónoma de Nuevo León*, 9:164–170.
29. Gilbertson R.L. y L. Ryvarden. 1986. North American Polypores. Volume 1: *Abortiporus-Lindtneria*. 433 S., 209 Abb. Oslo 1986. *Fungiflora A/S*
30. González A.G., León F., Rivera A., Padrón J., González-Plata J., Zuluaga J., Quintana J., Estévez F. y J. Bermejo. 2002. New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *Journal of Natural Products*, 65:417–421.
31. Gursoy N., Sarikürkçü C., Cengiz M. y M.H. Solak. 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food Chemistry Toxicology*, 47:2381–2388.
32. Guzmán G. 2008. Diversity and use of traditional mexican medicinal Fungi (A review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(3):209–217.
33. Guzmán G. y T. Herrera. 1971. Especies de Macromicetos citados en México, II. *Fistulinaceae, Meruliaceae y Polyporaceae*. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 5:57–67.
34. Guzmán M.S., Santafé G.G., Salcedo M.M., Angulo A.A. y O. Torres. 2013. Estudio químico y actividades antioxidante y bactericida de *Ganoderma applanatum*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1):88–94.
35. Hakkim F.L., Al-Buloshi M. y J. Achankunju. 2016. Chemical composition and anti-proliferative effect of Oman's *Ganoderma applanatum* on breast cancer and cervical cancer cells. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(2):145–151.
36. Hong S.G., Jeong W. y H.S. Jung. 2002. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia*, 94:823–833.
37. Hseu R.S., Wang H.H., Wang H.F. y J.M. Moncalvo. 1996. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA–PCR compared 556 with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1354–1363.

38. Hsu M.J., Lee S.S. y W.W. Lin. 2002. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(1):207-216.
39. Hu H., Ahn N.S., Yang X., Lee Y.S. y K.S. Kang. 2002. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *International Journal of Cancer*. 102:250-253.
40. Hu S.H., Liang Z.C., Chia Y.C., Lien J.L., Chen K.S., Lee M.Y. y J.C. Wang. 2006. Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6):2103–2110.
41. Huerta I., Molina J., Garnica M.G. y B. Yahuaca. 2016. Total polyphenols and antioxidant activity of *Ganoderma curtisii* extracts. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(4):136–141.
42. Huie C.W. y X. Di. 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of chromatography by analytic technology biomedical sciences*, 812:241–257.
43. Jiang J., Slivova V. y D. Sliva. 2006. *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation of human breast cancer cells by down-regulation of estrogen receptor and NF- κ B signaling. *International Journal of Oncology*. 29: 695-703 .
44. Kalac P. y L. Svodoba. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69:273–281.
45. Kalyoncu, F., Oska M. y K. Hüsniye, 2010. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology* 1: 195–199.
46. Kohda H., Tokumoto W., Sakamoto K., Fujii M., Hirai Y., Yamasaki K., Komoda Y., Nakamura H., Ishihara S. y M. Uchida. 1985. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chemistry and Pharmacology Bulletin*, 33:1367–1374.
47. Kim K.C. y I.G. Kim. 1999. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *International Journal of Molecular Medicine*, 4:273–277.
48. Kim H.W. y B.K. Kim. 2002. Recent advances on the biologically active triterpenoids of *Ganoderma lucidum*. In *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics*, Lin, Z.B., Ed. Beijing Medical University Press, Beijing. 10–19.
49. Kim S.W., Park S.S., Min T.J. y Yu K.H. 1999. Antioxidant activity of ergosterol peroxidase (5–8-Epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 α -ol) in *Armillariella mellea*. *Bulletin of Korean Chemical Society*, 20:819–823.
50. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. y J.A. Stalpers. 2008. *Dictionary of the fungi*. 10th ed., 272 p.

51. Ko H.H., Hung C.F., Wang J.P. y C.N. Linch. 2008. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69(1): 234–239.
52. Kobori M., Yoshida M., Ohnishi-Kameyama M. y H. Shinmoto. 2007. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 150(2):209–219.
53. Kornerup A. y J.H. Wanscher. 1981. *Methuen handbook of colour*. Kornerup, . 3ª Ed. Eyre Methuen. Londres, UK, 252 pp.
54. Kozarski M., Klaus A., Niksic M., Jakovljevic D., Helsper J.P.F.G. y L.J.L.D. Van Griensven. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129 (4):1667–75.
55. Kubota T., Asaka Y., Miura I. y H. Mori. 1982. Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Helvetica Chimica Acta*, 65(2): 611-619.
56. Largent D.L. 1973. *How to identify mushrooms to genus I: Macroscopics Features*. Mad River Press Inc. Eureka, California. 85 p.
57. Largent D., Johnson D. y R. Watling. 1977. *How to identify mushrooms to genus III: Microscopics Features*. Primera edición. Mad River Press Inc. Eureka, California. 148 p.
58. Lee I. H., Huang R. L., Chen C. T., Chen H. C., Hsu W. C. y Lu M.K. 2002. *Antrodia camphorate* polysaccharides exhibit antihepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters*, 209:61–65.
59. Lee S.S., Lee P.L., Chen C.F., Wang S.Y. y K.Y. Chen. 2003. Antitumor effects of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom)(Aphyllphoromycetidaeae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5:1–16.
60. Leliebre-Lara V., Monzote L., Pferschy-Wenzing E., Kunert O., Nogueiras-Lima, C. y R. Bauer. 2016. In vitro antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). *Molecules*, 21(8):1045.
61. Lin C.N., Tome W.P. y Won, S.J. 1991. Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products*, 54:998–1002.
62. Li X., Wu Q., Xie Y., Ding Y., Du W.W., Sdiri M., y B. Yang. 2015. Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth in vitro and in vivo by up-regulating multiple tumor suppressors. *Oncotarget*, 6(19):17832–17846.

63. Liang Y., Chen Y., Liu H., Luan R., Che T., Jiang S., Xie D. y H. Sun. 2011. The tumor rejection effect of protein components from medicinal fungus. *Biomedicine and Preventive Nutrition* 1:245–254.
64. Lindequist, U. 1995. Structure and biological activity of triperpens, polysaccharides and other constituents of *Ganoderma lucidum*. In: *Recent advances in Ganoderma lucidum Research*, B.K. Kim, I.H. Kim y Y.S. Kim (Eds.). The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea. 61–91.
65. Liu Y.J., Shen J., Xia Y.M., Zhang J. y H.S. Park. 2012. The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells? *Carbohydrate Polymers*, 90:1210–1215.
66. Lv G.P., Zhao J., Duan J.A., Tang Y.P y S.P. Li. 2012. Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chemistry Central Journal*, 6(1):10–18.
67. Maji P.K., Sen I.K., Devi K.S.P., Maiti T.K., Skidar, S.R. y S.S. Islam. 2013. Structural elucidation of a biologically active heteroglycan isolated from a hybrid mushroom of a *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. *Carbohydrates Research*, 368:22-28.
68. Márquez-Fernández O., Juárez J. y A. Trigos. 2014. Aislamiento e identificación de esteroides de una cepa comercial de *Pleurotus sp.* *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 20(2): 227–235.
69. Martínez A.T., Barrasn J.M., Prieto A. y M.N. Blanco. 1991. Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. *Mycology Research*, 95(7):782–784.
70. Ma L., Chen H., Dong P. y X. Lu. 2013. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*, 139: 503–508.
71. Mau J.L. Tsai S.Y., Tseng Y.H. y S.J. Huang. 2005(a). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 93:641–649.
72. Mau J.L., Tsai S.Y., Tseng Y.H. y S.J. Huang. 2005(b). Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT Food Science and Technology*, 38: 589–597.
73. Mendoza G., Suárez-Medellín J., Espinoza C., Ramos-Ligonio A., Fernández, J.J. y M. Norte. 2015. Isolation and characterization of bioactive metabolites from fruiting bodies and mycelial culture of *Ganoderma oerstedii* (Higher Basidiomycetes) from Mexico. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(6):501–509.
74. Ming D.S., Chilton J., Fogarty F. y G.H.N. Towers. 2002. Chemical constituents of *Ganoderma applanatum* of British Columbia forests. *Fitoterapia*, 73:147–152.

75. Miyazaki T. y M. Nishijima. 1982. Structural examination of an alkali-extracted, water-soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Research, 109: 290-294.
76. Mizuno T. 1994. Estudio de las sustancias bioactivas presentes en el hongo Reishi (*Ganoderma lucidum*) y sus efectos medicinales. Mushroom Science and Biotechnology, 1:53–59.
77. Mizuno T., Saito H., Nishitoba T. y H. Kawagish. 1995. Antitumor active substances from mushrooms. Food Reviews International, 11(1): 23–61.
78. Mizuno T. 1997; Studies on bioactive substances and medicinal effect of Reishi, *Ganoderma lucidum* in Japan. Proceedings of the 1st International Symposium on *Ganoderma lucidum* in Japan. Tokyo, Japan. 121–127 pp.
79. Moncalvo J.M. 2000. Systematics of *Ganoderma*, in: *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops. Flood J., Bridge P.B y M. Holdernes (Ed). CABI Publishing. London U.K. 2:26–34.
80. Moncalvo J.M., Wang H.F. y R.S. Hseu. 1995. Gene phylogeny Moncalvo J.M., Wang H.H. y R.S. Hseu. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. Mycologia, 87: 223–238.
81. Moncalvo J.M. y L. Ryvarden. 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk, Synopsis Fungorum 11:1–109.
82. Moradali M.F., Hedjaroude G.A., Mustavi H., Abbasi M., Ghods S. y A. Sharifi-Tehrani. 2007. The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. Mycotaxon 99:251–269.
83. Morigiwa A., Kitabatake K, Fujimoto Y. y N. Ikekawa. 1986. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 34 (7):3025–3028.
84. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. Journal of Immunology Methods, 65:55–63.
85. Mothana R., Jansen R., Julich W. y U. Lindequist. 2000. Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. Journal of natural products, 63: 416-418.
86. Mueller G.M., Shcmit J.P., Leacock P.R., Buyck B. y J. Cifuentes. 2007. Global diversity and distribution of macro fungi. Biodiversity and Conservation, 16:37–48.
87. Müller C.L., Kumagai T., O'Kelly J., Seeram N.P., Heber D. y H.P. Koeffler. 2006. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple mieloma cells. Leukimia Research, 30(7):841–848.

88. Nagaraj K., Mallikarjun N., Naika R. y T.M. Venugopal. 2014. Antioxidative activities of wild macro fungi *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 7(2):166–171.
89. Nam K.S., Jo Y.S., Kim Y.H., Hyun J.W. y H.W. Kim. 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. Life Sciences, 69(2):229–237.
90. Nishitoba T., Sato H., Shirasu S. y S., Sakumura. 1986. Evidence of the strain specific terpenoid pattern of *Ganoderma lucidum*. Agricultural and Biological Chemistry, 50:2151–2154.
91. Nie S., Zhang H., Li W. y M. Xien. 2013. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 1:10–20.
92. Niedermeyer T.H., Lindequist U., Mentel R., Gördes D., Schmidt E., Thurow K. y M. Lalk. 2005. Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. Journal of Natural Products, 68(12):1728–1731.
93. Nieto I.J. y M.A. Valencia. 2002. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma australe*. Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 47(4):511–516.
94. Papaspyridi L.M., Sinanoglou V.J., Strati I.F., Katapodis P. y P. Christakopoulos. 2013. Fatty acid profile of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma australe* grown naturally and in a batch bioreactor. Acta alimentaria, 42(3):328–337.
95. Paterson, R.R.M. (2006). *Ganoderma* a therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry, 67:1985–2001.
96. Pedneault K., Angers P., Gosselin A. y R.J Tweddel. 2006. Fatty acid composition of lipids belonging to the family Boletaceae. Mycology Research, 110:1179–1183.
97. Pedneault K., Angers, P., Avis, T., Gosselin, A. y R.J Tweddel. 2007. Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. '*citrino-pileatus*' grown at different temperatures. Mycology Research, 111: 1228–1234.
98. Pedneault K., Angers P., Gosselin A. y R.J.Tweddell. 2008. Fatty acid profiles of polar and neutral lipids of ten species of higher basidiomycetes indigenous to eastern Canada. Mycological Research, 112:1428–1434.
99. Penzete G., Assunção A., Dos Santos G. C., Bracht A., Giatti C., Gandolfi C. y R. Marina. 2012. Antioxidant properties of the most common edible mushrooms consumed in Brazil. En: Andres S., Baumann N. (Eds.) *Musrooms: types, properties and nutrition*. Nova science Publishers Inc. 285–295
100. Pereira D.M., Correia-da-Silva G., Valentão P., Teixeira N. y P.B Andrade. 2014. Palmitic acid and ergosta-7,22-dien-3-ol contribute to the apoptotic effect and cell

cycle arrest of an extract from *Marthasterias glacialis* L. in neuroblastoma cells. *Marine Drugs*, 12(1):54–68.

101. Pérez C.A., Santafé G.G., Torres M.G., Torres O.L., Montaña M.C., y S.M. Robledo. 2016. Lipid composition and evaluation of the antioxidant and leishmanicidal activities of the basidiomycete *Ganoderma* sp. *Revista cubana de plantas medicinales*, 21(3):318–331.
102. Pilotti C.A., Sanderson F.R., Aitken E. y W. Armstrong. 2004. Morphological variation and host range of two *Ganoderma* species from Papua New Guinea. *Mycopathologia*, 158(2):151–265.
103. Postemsky P., Figlas D., Delmastro S., Devalis R. y N. Curvetto. 2006. Optimizing *Grifola sordulenta* and *Grifola gargal* growth in agar and liquid nutrient media. *Micologia Aplicada Internacional*, 18:712.
104. Prasad Y. y W.E.G. Wesely. 2008. Antibacterial activity of the bio-multidrug (*Ganoderma lucidum*) on multidrug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Advanced Biotechnology*, 10:9–16.
105. Protiva J., Skorkovska H., Urban J. y A. Vystřil. 1979. Triterpenes and steroids from *Ganoderma applanatum*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 45: 2710–2713.
106. Quereshi S., Pandey A.K y S.S. Sandhu. 2010. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. *People Journal of Scientific Research*, 3(1):9–13.
107. Ramos-Ligonio A., López-Monteon A. y A. Trigos. 2012. Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy Research*, 26(6):938–943.
108. Ramos-Ligonio A., López-Monteon A., Lagunes-Castro M.S., Suárez-Medellín J., Espinoza C., Mendoza G. y Trigos A. 2017. In Vitro Expression of Toll-Like Receptors and Proinflammatory Molecules Induced by Ergosta-7,22-Dien-3-One Isolated from a Wild Mexican Strain of *Ganoderma oerstedii* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(3):203–211.
109. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y C.Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9): 1231–1237.
110. Reis F.S., Martins A., Barros L. y I.C.F.R. Ferreira. 2012. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food Chemistry Toxicology*, 50:1201–1207.
111. Ren L., Perera C. y Y. Hemar. 2012. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: A review. *Food and Function*, 3:1118–1130.

112. Richter C., Wittstein K., Kirk M.P. y M. Stadler. 2014. An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Diversity*, DOI 10.1007/s13225-014-0313-6.
113. Rivera A., Nieto I.J. y M.A. Valencia. 2002. Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción esterólica de once hongos colombianos. *Revista Colombiana de Química*, 31(2):95–102.
114. Ríos-Cañavate J.L. 2008. *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades inmunoestimulantes. *Revista de Fitoterapia*, 8(2):135–146.
115. Rösecke J., Pietsch M. y W.A. König. 2000. Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*, 54:747–750.
116. Russo A., Cardile V., Piovano M., Caggia S., Espinoza C.L. y J.A. Garbarino. 2010. Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-ergosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 184(3):352–358.
117. Ryvarden L. 1991. Genera of Polipores, Nomenclature and Taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5. Fungiflora, Oslo. 349 p.
118. Ryvarden L. 2000. Studies in neotropical Polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia*, 92(1):181–191.
119. Ryvarden L. y R.L. Gilbertson. 1993. European polypores Part 1: Abortiporus-Lindtneria. *Synopsis Fungorum* 6. Fungiflora. Oslo. 256-282 pp.
120. Saltarelli R., Ceccaroli P., Lotti M., Zambonelli A., Buffalini M., Casadei L., Vallorani L. y V. Stocchi. 2009. Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry*. 116:143–151.
121. Saltarelli R., Ceccaroli P., Buffalini M., Vallorani L., Casadei L., Zambonelli A., Lotti M., Badalyan S. y V. Stocchi. 2015. Biochemical characterization and antioxidant and antiproliferative activities of different *Ganoderma* collections. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25:16–25.
122. Sánchez R. 1980. Macromicetos patógenos y destructores de la madera de los bosques de la Meseta Tarasca, Michoacán. *Revista Ciencia Forestal*, 5:4–19.
123. Sankaran M., Isabella S. y K. Amranth. 2017. Anti proliferative Potential of Ergosterol : A Unique Plant Sterol on Hep2 Cell Line. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 4:1737–1742.
124. Sato N., Ma C.M., Komatsu K., y Hattori, M. 2009. Triterpene-farnesyl hydroquinone conjugates from *Ganoderma sinense*. *Journal of Natural Products*, 72:958-961.

125. Seo G.S. y P.M. Kirk. 2000. Ganodermataceae: Nomenclature and classification. In: *Ganoderma* diseases of perennial crops, J. Flood, P.D. Bridge, M. Holdernes (Ed.). CABI Publishing. London U.K. 3–22.
126. Seo H.W., Hung T.M., Na M., Jung H.J., Kim J.C., Choi J.S., Kim J.H., Lee H.K., Lee I., Bae K., Hattori M. y B.S. Min. 2009. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. *Archives of Pharmacal Research*, 32(11):1573–1579.
127. Shiao M.S. 2003. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record*, 3(3):172–178.
128. Shoji O. 1999. Effect of water potencial on fruitbody formation of *Lentinula edodes* in sawdust-based substrate. *Journal of Wood Science*, 45:337–342.
129. Singdevsachan S.K., Patra J.K., Tayung K. y H. Thatoi. 2017. Chemical constituents, antioxidative and antibacterial properties of medicinal mushrooms collected from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(2):559–570.
130. Singleton V. L., Orthofer R., y R.M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299:152–178.
131. Sliva D., Labarrere C., Slivova V., Sediak M., Lloyd F.P. y N.W.Y. Ho. 2002. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298:603–612.
132. Smina T.P., Mathew J., Janardhanan K.K. y T.P.A. Devasagayam. 2011. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. *Environment Toxicology and Pharmacology*, 32:438–446.
133. Stalpers J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Studies in Mycology*, 16:1-248.
134. Stanley G., Harvey K., Slivova V., Jiang J. y D. Sliva. 2005. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta 1 from prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330:46–52.
135. Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushroom. 3^a. Edition. Ten Speed Press, Olympia, WA. Berkeley, California. 349–366 pp.
136. Stavinoha W., Satsangi N. y S. Weinstravels. 1995. Study of the anti-inflammatory efficacy of *Ganoderma lucidum*. In: B.K. Kim and Y.S. Kim (ed): *Recent Advances in Ganoderma lucidum Research*. Seoul, Korea. The pharmaceutical society of Korea, 9–21.

137. Steyaert R.L. 1972. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Lieden herbaria. *Persoonia*, 7:55–188.
138. Still W.C., Kahn M. y A. Mitra. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry*, 43(14):2923–2925.
139. Stojkovic D.S., Barros L., Calhelha R.C., Glamoclija J., Circ A., Van Griesven L.J., Sokovic M. e I.C. Ferreira. 2013. A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, On line 1:6. DOI: 10.3109/09637486.2013.832173.
140. Sturley S.L. 2000. Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 1529:155-163.
141. Suárez-Medellín J., Mendoza G., Espinoza C., Suárez-Quiroz M. y A. Trigos. 2014. Lanostanoids isolated from the basidiocarps of a mexican strain of medicinal fungus *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. *Latin American Journal of Pharmacy*, 33(2):224–230.
142. Subbiah M.T.R. y W. Abplanalp. 2003. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73(1): 19-23.
143. Sun S.J., Gao W., Lin S.Q., Zhu J., Xie B.G. y Z.B. Lin. 2006. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* populations with a novel molecular marker SRAP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72:537-543
144. Takaku T., Kimura Y. y H. Okuda. 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 131(18): 1409–1413.
145. Tamrakar S., Tran H.B., Nishida M., Kaifuchi S., Suhara H., Doi K., Fukami K., Parajuli G.P. y K. Shimizu, 2016. Antioxidative activities of 62 wild mushrooms from Nepal and the phenolic profile of some selected species. *Journal of Natural Medicine* 70 (4): 769-779.
146. Thang T.D., Kuo P.C., Hwang T.L., Yang M.L., Ngoc N.T., Han T.T., Lin C.W. y T.S. Wu. 2013. Triterpenoids and steroids from *Ganoderma mastoporum* and their inhibitory effects on superoxide anion generation and elastase release. *Molecules*, 18(11):14285–14292.
147. Tonjock R.K. y M.M Afui. 2011. Secondary metabolites of oil palm isolates of *Ganoderma zonatum* Murrill. from Cameroon and their cytotoxicity against five human tumor cell lines. *African Journal of Biotechnology*, 10(42): 8440-8447.
148. Torres-Torres M.G., Ryvarden L. y L. Guzmán-Dávalos. 2015. *Ganoderma* subgénero *Ganoderma* en México. *Revista Mexicana de Micología*, 41:27–45.

149. Trigos A. y J. Suárez-Medellín. 2011. Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología*, 34:63-83.
150. Tseng Y.H., Yang J.H. y J.L. Mau. 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 107 (2):732–738.
151. Valenzuela R., De la Huerta C.P. y R. Fernández. 2002. Los Poliporáceos de México V. Algunas especies del norte del estado de Querétaro. *Polibotánica*, 14: 85-122.
152. Valenzuela R., Raymundo T. y M.R. Palacios. 2004. Macromicetos que crecen sobre *Abies religiosa* en el eje neovolcánico transversal. *Polibotánica*, 18:33–51.
153. Valenzuela R., Raymundo T. y J. Cifuentes. 2005. La familia Hymenochaetaceae en México II. Especies poco conocidas del género *Phellinus*. *Revista Mexicana de Micología*, 20:13–19
154. Valenzuela R., Palacios-Pacheco M.R., Raymundo T. y S. Bautista-Hernández. 2006. Especies de poliporáceos poco conocidas en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77:35 –49.
155. Valenzuela R., Raymundo T., Palacios-Pacheco M. R y R. Díaz-Moreno. 2008. La familia Polyporaceae en México. Nuevos registros de Antrodia (Basidiomycota, Polyporales). *Revista Mexicana de Micología*, 28:41–47.
156. Vázquez-Mendoza S. y R. Valenzuela. 2012. Macromicetos de la Sierra Norte de Puebla, México. *Naturaleza y desarrollo*, 8(1): 43–58.
157. Wang S.Y., Hsu M.L., Hsu H.C, Tzeng C.H., Lee S.S., Shiao M.S. y C.K. Ho. 1997. The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer*, 70:699–705.
158. Wang J. y L. Zhang. 2009. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -d-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Research*, 344(1):105–112
159. Wasser S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:258–274.
160. Wasser S.P. 2005. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). In: Coates P.M., Blackman M.R., Cragg G.M., Levine M., Moss J., White J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Marcel Dekker. Nueva York. 603–622.
161. Wiater A., Paduch R., Choma A., Pleszczyńska M., Siwulski M., Dominik J., Janusz G., Tomczyk M. y J. Szczodrak. 2012. Biological study on carboxymethylated (1-3)-d-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51:1014–1023.

162. Wiseman H. 1993. Vitamin D is a membrane antioxidant ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Letters*, 326: 285–288.
163. Xie J.T., Wang C.Z., Wicks S., Yin J.J., Kong J., Li J., Li Y.C. y C.S. Yuan. 2006. *Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer cells. *Experimental Oncology*, 28:25–29.
164. Yang H.L., Wu T.X. y K.C. Zhang. 2004. Enhancement of mycelial growth and polysaccharide production in *Ganoderma lucidum* (the Chinese medicinal fungus Lingzhi) by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters*, 26(10):841-844.
165. Yang J.H., Du Y.M., Huang R.H., Sun L.P., Liu H. y X.H. Gao. 2005. Chemical modification and antitumour activity of Chinese lacquer polysaccharide from lac tree *Rhus vernicifera*. *Carbohydrate polymers*, 59:101–107.
166. Yang P., Liu C., Wang H., Li J., Wang Z., Xiao W. Chen, R. 2014. Chemical constituents of *Poria cocos*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 39(6): 1030-1033.
167. Yazawa Y., Yokota M. y K. Sugiyama. 2000. Antitumor promoting effect of an active component of *Polyporus*, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23:1298–1302.
168. Yoon S.J., Yu M.A., Pyun Y.R., Hwang J.K., Chu D.C. y L.R. Juneja. 2003. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*, 112:151–158.
169. Yue G.G.L., Fung K.P., Tse G.M.K., Leung P.C. y C.B.S. Lau. 2006. Comparative studies of various *Ganoderma* species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities In vitro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 12(8):777–789.
170. Zheng L., Jia D., Fei X., Luo X., y Z. Yang. 2007. An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITSPCR–RFLP. *Microbiological Research*, 164:312–321.
171. Zhou L.W., Cao Y., Wu S.H., Vlasák J., Li D.W., Li M.J. y Y.C. Dai. 2015. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry*, 114:7–15.

13. ANEXOS

AT1. Principales compuestos que se han identificado en *G. applanatum*.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>G. applanatum</i>	(3 β ,22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol)	
	17-isopropil- $\Delta^{5,7}$ -3 β -idroxianrostadieno	Segundo <i>et al.</i> , 2013
	4,4-dimetil-ergosta-5,7,25(26)-trien-3 β -ol	Segundo <i>et al.</i> , 2013
	4,4-dimetil-ergosta-7,24(28)-dien-3 β -ol	Segundo <i>et al.</i> , 2013
	4-metil-ergosta-22-en-3 β -ol	Segundo <i>et al.</i> , 2013
	5 α ,8 α -epidioxo-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol (peróxido de ergosterol)	
	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	Ming <i>et al.</i> , 2002
	Ácido 2-hidroxihexacosanoico	Ming <i>et al.</i> , 2002
	Ácido 7 α ,8 α -epoxi-15 α -hidroxi-3,12,23-trioxo-5 α -lanosta-9(11),20-dien-26 oico (ácido applanoxídico A)	
	Ácido 7 α ,8 α -epoxi-15 β ,20-dihidroxi-3,12,23-trioxo-5 α -lanosta-9(11),16-dien-26 oico (ácido applanoxídico G)	
	Ácido 7 α ,8 α -epoxi-20-hidroxi-3,12,15,23-tetraoxo-5 α -lanosta-9(11),16-dien-26 oico (ácido applanoxídico C)	
	Ácido 7 α ,8 α -epoxi-3,12,15,23-tetraoxo-5 α -lanosta-9(11),20-dien-26 oico (ácido applanoxídico F)	
	Ácido ganodérico A	
	Ácido ganodérico D	Ming <i>et al.</i> , 2002
	Ácido ganodérico G	
	Applanatina A	Fushimi <i>et al.</i> , 2010
	Applanatina B	Fushimi <i>et al.</i> , 2010
	Ergosta-5,7,9,24(28)-tetraen-3 β -ol	Segundo <i>et al.</i> , 2013
	Ergosta-7,22-dien-3-ona	
	Ergosta-7,22-dien-3 β -ol (estelasterol)	
	Ergosta-7-en-3 β -ol (fungisterol)	
	Estigmasta-5-,22-dien-3 β -ol	Segundo <i>et al.</i> , 2013
	Ganoderma aldehído	Ming <i>et al.</i> , 2002
	Ganoderma aldehído A-E	Fushimi <i>et al.</i> , 2010
	Ganodermicina	Jung <i>et al.</i> , 21011
	β -amirenona	Ming <i>et al.</i> , 2002
	β -amyrin acetato	Ming <i>et al.</i> , 2002

AT2. Principales triterpenos reportados para *G. curtisii*.

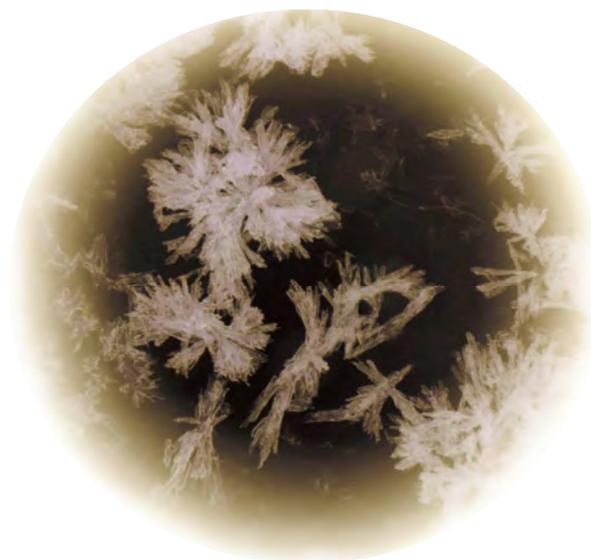
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
	3,7,15-tetrahidroxi-4-4,14-trimetil-1-11-oxochol-8-en-24-oico acido	
	3-hidroxi-4,4,14-trimetil-7,11,15-troxochol-8-en-24-oico acido	
<i>G. curtisii</i>	7,15-trihidroxi-4,4,14-trimetil-3,11,15-diotroxochol-8-en-24-oico acido	Welti et al., 2015
	Acido ganoderico A	
	Ácido lucidenico A	
	Ácido lucidenico F	

AT3. Especies del género *Ganoderma* con reporte de los esteroides 1–4.

COMPUESTO	ESPECIES	REFERENCIA
1	<i>G. australe</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. curtisii</i> , <i>G. lipsiense</i> , <i>G. oerstedii</i> , <i>G. zonatum</i> , <i>G. lucidum</i>	Ming et al., 2002; Paterson ,2006; Seo et al., 2009; Guzmán et al., 2013; Mendoza, et al., 2015.
2	<i>G. australe</i> , <i>G. amboinense</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. carnosum</i> , <i>G. concinnum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. mastoporum</i> , <i>G. neojaponicum</i> , <i>G. pfeifferi</i> , <i>G. tsugae</i> , <i>G. zonatum</i> .	Gan et al., 1998; González et al., 2002; Paterson ,2006; Seo et al., 2009; Tonjock y Afui, 2011; Guzmán et al., 2013; Thang et al., 2013; Suárez-Medellin et al., 2014.
3	<i>G. australe</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. concinnum</i> , <i>G. mastoporum</i> , <i>G. oerstedii</i> , <i>G. lucidum</i>	González et al. ,2002; Seo et al., 2009; Mendoza, et al., 2015
4	<i>G. australe</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. concinnum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. mastoporum</i> , <i>G. neojaponicum</i> , <i>G. oerstedii</i> , <i>G. pfeifferi</i> , <i>G. Tsugae</i>	González et al. 2002; Niedermeyer et al. ,2005; Paterson, 2006; Ko et al., 2008; Thang et al., 2013; Suárez-Medellin et al., 2014; Mendoza, et al., 2015.

AT4. Actividad biológica de los esteroides aislados de *G. curtisii* y *G. applanatum*.

COMPUESTO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
1	Reducción de dolor por inflamación, reducción de accidentes cardiovasculares, antioxidante, antiinflamatorio, antihiperlipidémico, precursor de la vitamina D, inhibe crecimiento tumoral al inducir la apoptosis, inhibe la angiogénesis y el crecimiento celular de Sarcoma 180 <i>in vitro</i> .	Wiseman, 1993; Bok <i>et al.</i> , 1999; Yazawa <i>et al.</i> , 2000; Takaku <i>et al.</i> , 2001; Subbiah & Abplanalp, 2003; Hu <i>et al.</i> , 2006.
2	Antiinflamatorio, antiviral contra herpes simple, produce apoptosis en cáncer de mama (MCF-7) y neuroblastoma (SH-SY5Y), inhibe el crecimiento celular de cáncer de hígado y carcinoma (KB)	Lin <i>et al.</i> , 1991; Niedermeyer <i>et al.</i> , 2005; Trigos, A. y Suárez-Medellín, 2011; Pereira <i>et al.</i> , 2014.
3	Antitumoral, anticancerígeno, antimelanogénico, antiateroesclerosis, inhibe el crecimiento celular de cáncer colorectal HT29 <i>in vitro</i> .	Kim <i>et al.</i> , 1999; Rösecke <i>et al.</i> , 2000; Takaku <i>et al.</i> , 2001; Kobori <i>et al.</i> , 2007; Russo <i>et al.</i> , 2010; Trigos & Suárez-Medellín, 2011.
4	Antioxidante, antiinflamatoria	Ko <i>et al.</i> , 2008; Thang <i>et al.</i> , 2013



AF1. Microscopía de los cristales de ergosterol en microscopio óptico en 40X

AT5. Análisis estadístico de los extractos etanólicos para antioxidantes

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza		Mínimo	Máximo
					para la media al 95%			
					Límite inferior	Límite superior		
GcA-b	3	64.9459	2.40268	1.38719	58.9773	70.9145	62.79	67.54
GcA-bc	3	47.8284	2.60117	1.50178	41.3667	54.2901	45.10	50.27
GcA-m	3	50.4176	1.51550	.87497	46.6529	54.1823	48.98	52.00
GcT-b	3	53.2945	1.14173	.65918	50.4583	56.1307	52.00	54.16
GcZ-b	3	66.3844	.99659	.57538	63.9087	68.8600	65.81	67.54
GaA-b	3	67.5351	.43153	.24915	66.4632	68.6071	67.10	67.97
GaA-m	3	51.9999	2.28347	1.31836	46.3275	57.6723	50.27	54.59
GbT-b	3	68.5421	1.38719	.80089	65.0961	71.9880	67.54	70.12
GbT-m	3	67.8228	1.24573	.71922	64.7283	70.9174	67.10	69.26
Total	27	59.8634	8.47352	1.63073	56.5114	63.2154	45.10	70.12

ANOVA DE UN FACTOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1814.796	8	226.849	78.498	.000
Intra-grupos	52.018	18	2.890		
Total	1866.814	26			

PRUEBA TUKEY					
SUBCONJUNTOS $\alpha=0.05$					
ESPECIE	N	A	B	C	D
GcA-bc	3	47.83			
GcA-m	3	50.42	50.42		
GaA-m	3	52.00	52.00		
GcT-b	3		53.29		
Tukey ^a GcA-b	3			64.95	
GcZ-b	3			66.38	
GaA-b	3			67.54	
GbT-m	3			67.82	
GbT-b	3			68.54	

AT6. Análisis estadístico de los extractos acuosos para antioxidantes

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza		Mínimo	Máximo
					para la media al 95%			
					Límite inferior	Límite superior		
GcA-b	3	56.4591	.24915	.14384	55.8402	57.0780	56.32	56.75
GcA-bc	3	59.7675	4.16157	2.40268	49.4296	70.1054	55.02	62.79
GcA-m	3	66.3844	.49829	.28769	65.1466	67.6222	65.81	66.67
GcT-b	3	64.8021	1.63376	.94325	60.7436	68.8606	63.65	66.67
GcZ-b	3	59.9114	2.93739	1.69591	52.6145	67.2083	57.61	63.22
GaA-b	3	61.6375	.24915	.14384	61.0186	62.2564	61.49	61.93
GaA-m	3	67.9667	1.97754	1.14173	63.0542	72.8792	66.24	70.12
GbT-b	3	66.8159	.89831	.51864	64.5844	69.0474	65.81	67.54
GbT-m	3	65.2336	.65918	.38058	63.5961	66.8711	64.51	65.81
Total	27	63.2198	4.10263	.78955	61.5969	64.8427	55.02	70.12

PRUEBA TUKEY					
SUBCONJUNTOS $\alpha = 0.05$					
ESPECIE	N	A	B	C	D
GcA-b	3	56.5			
GcA-bc	3	59.8	59.8		
GcZ-b	3	59.9	59.9		
GaA-b	3	61.6	61.6	61.6	
Tukey ^a GcT-b	3		64.8	64.8	64.8
GbT-m	3		65.2	65.2	65.2
GcA-m	3			66.4	66.4
GbT-b	3			66.8	66.8
GaA-m	3				68

ANOVA DE UN FACTOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	369.340	8	46.168	12.170	.000
Intra-grupos	68.281	18	3.793		
Total	437.622	26			

AT7. Análisis estadístico de los extractos hexánicos para antioxidantes

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					GcA-b	3		
GcA-bc	3	34.4500	.94144	.54354	32.1113	36.7887	33.54	35.42
GcA-m	3	44.8077	1.08600	.62701	42.1099	47.5054	43.80	45.96
GcT-b	3	29.8478	1.79662	1.03728	25.3847	34.3109	27.83	31.29
GcZ-b	3	30.2793	1.38719	.80089	26.8334	33.7253	28.70	31.29
GaA-b	3	36.1770	3.46125	1.99836	27.5787	44.7752	32.58	39.49
GaA-m	3	34.5947	3.35192	1.93523	26.2680	42.9213	30.85	37.33
GbT-b	3	37.3277	3.83556	2.21446	27.7997	46.8558	34.31	41.64
GbT-m	3	41.4992	3.67016	2.11897	32.3821	50.6164	37.33	44.23
Total	27	35.2818	5.63038	1.08357	33.0545	37.5091	27.83	45.96

PRUEBA TUKEY							
ESPECIE	N	SUBCONJUNTOS					$\alpha = 0.05$
		A	B	C	D	E	
GcA-b	3	28.6					
GcT-b	3	29.8	29.8				
GcZ-b	3	30.3	30.3	30.3			
GcA-bc	3	34.5	34.5	34.5	34.5		
Tukey ^a GaA-m	3	34.6	34.6	34.6	34.6		
GaA-b	3		36.2	36.2	36.2		
GbT-b	3			37.3	37.3		
GbT-m	3				41.5	41.5	
GcA-m	3					44.8	

ANOVA DE UN FACTOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	706.130	8	88.266	13.453	.000
Intra-grupos	118.099	18	6.561		
Total	824.230	26			

AT8. Análisis estadístico de los extractos etanólicos para fenoles totales

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza		Mínimo	Máximo
					para la media al 95%			
					Límite inferior	Límite superior		
GcA-b	3	19.0931	.63670	.36760	17.5114	20.6747	18.73	19.83
GcA-bc	3	38.5757	3.30837	1.91009	30.3572	46.7941	35.27	41.88
GcA-m	3	13.5793	.63624	.36733	11.9988	15.1598	13.21	14.31
GcT-b	3	54.3823	3.54508	2.04675	45.5759	63.1888	51.81	58.43
GcZ-b	3	43.3543	1.68431	.97244	39.1703	47.5384	41.88	45.19
GaA-b	3	61.3667	1.68431	.97244	57.1826	65.5507	59.53	62.84
GaA-m	3	27.9157	.63682	.36767	26.3337	29.4976	27.55	28.65
GbT-b	3	58.4259	1.10279	.63670	55.6864	61.1653	57.32	59.53
GbT-m	3	100.3318	1.10279	.63670	97.5924	103.0713	99.23	101.43
Total	27	46.3361	25.41472	4.89107	36.2824	56.3898	13.21	101.43

ANOVA DE UN FACTOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	16727.938	8	2090.992	573.141	.000
Intra-grupos	65.669	18	3.648		
Total	16793.607	26			

PRUEBA TUKEY								
ESPECIE	N	SUBCONJUNTOS						
		A	B	C	D	E	F	G
GcA-m	3	13.6						
GcA-b	3		19.1					
GaA-m	3			27.9				
GcA-bc	3				38.6			
Tukey ^a GcZ-b	3				43.4			
GcT-b	3					54.4		
GbT-b	3					58.4	58.4	
GaA-b	3						61.4	
GbT-m	3							100

AT9. Análisis estadístico de los extractos acuosos para fenoles totales

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
GcA-b	3	84.5252	1.68454	.97257	80.3406	88.7098	82.69	86.00
GcA-bc	3	146.6490	1.91009	1.10279	141.9041	151.3939	144.44	147.75
GcA-m	3	96.6557	1.68431	.97244	92.4716	100.8397	94.82	98.13
GcT-b	3	55.1173	1.10250	.63653	52.3786	57.8561	54.02	56.22
GcZ-b	3	72.3943	.63682	.36767	70.8124	73.9763	71.66	72.76
GaA-b	3	58.7937	1.27363	.73533	55.6298	61.9576	57.32	59.53
GaA-m	3	47.7657	.63682	.36767	46.1837	49.3476	47.40	48.50
GbT-b	3	104.3754	.63670	.36760	102.7938	105.9570	103.64	104.74
GbT-m	3	63.9398	1.10279	.63670	61.2003	66.6793	62.84	65.04
Total	27	81.1351	29.91517	5.75718	69.3011	92.9692	47.40	147.75

ANOVA DE UN FACTOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	23238.667	8	2904.833	1791.477	.000
Intra-grupos	29.187	18	1.621		
Total	23267.854	26			

PRUEBA TUKEY											
	ESPECIE	N	SUBCONJUNTOS							$\alpha = 0.05$	
			A	B	C	D	E	F	G		H
Tukey ^a	GaA-m	3	47.77								
	GcT-b	3		55.12							
	GaA-b	3			58.79						
	GbT-m	3				63.94					
	GcZ-b	3					72.39				
	GcA-b	3						84.53			
	GcA-m	3							96.66		
	GbT-b	3								104.38	
	GcA-bc	3									146.65

AT10. Análisis estadístico de los extractos hexánicos para fenoles totales

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
GcA-b	3	20.9310	1.10279	.63670	18.1916	23.6705	19.83	22.03
GcA-bc	3	22.1167	1.02754	.59325	19.5641	24.6692	21.45	23.30
GcA-m	3	53.6470	3.18351	1.83800	45.7387	61.5553	51.81	57.32
GcT-b	3	38.9430	2.29552	1.32532	33.2406	44.6454	36.37	40.78
GcZ-b	3	25.7100	2.77536	1.60235	18.8156	32.6044	23.14	28.65
GaA-b	3	51.0740	2.29552	1.32532	45.3716	56.7764	48.50	52.91
GaA-m	3	129.3719	.63670	.36760	127.7903	130.9536	129.00	130.11
GbT-b	3	21.2986	1.68454	.97257	17.1140	25.4833	19.83	23.14
GbT-m	3	89.3040	1.91009	1.10279	84.5590	94.0489	88.20	91.51
Total	27	50.2662	35.69432	6.86937	36.1460	64.3865	19.83	130.11

ANOVA DE UN FACTOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	33051.114	8	4131.389	990.487	.000
Intra-grupos	75.079	18	4.171		
Total	33126.193	26			

PRUEBA TUKEY							
ESPECIE	N	SUBCONJUNTOS $\alpha = 0.05$					
		A	B	C	D	E	F
GcA-b	3	20.9					
GbT-b	3	21.3					
GcA-bc	3	22.1					
GcZ-b	3	25.7					
Tukey^a GcT-b	3		38.9				
GaA-b	3			51.1			
GcA-m	3			53.6			
GbT-m	3				89.3		
GaA-m	3					129	

AT11. Análisis estadístico de los extractos para actividad radicalaria ABTS.

Muestras	Subconjuntos (Tukey)	Media cuadrática
GbT-b (etanol)	A	68.542
GaA-m (agua)	A B	67.967
GbT-m (etanol)	A B	67.823
GaA-b (etanol)	A B	67.535
GbT-b (agua)	A B	66.816
GcA-m (agua)	A B C	66.384
GcZ-b (etanol)	A B C	66.384
GbT-m (agua)	A B C	65.234
GcA-b (etanol)	A B C	64.946
GcT-b (agua)	A B C	64.802
GaA-b (agua)	B C D	61.638
GcZ-b (agua)	C D E	59.911
GcA-bc (agua)	C D E	59.768
GcA-b (agua)	D E F	56.459
GcT-b (etanol)	E F G	53.295
GaA-m (etanol)	F G	52.000
GcA-m (etanol)	F G H	50.418
GcA-bc (etanol)	G H I	47.828
GcA-m (hexano)	H I	44.808
GbT-m (hexano)	I J	41.499
GbT-b (hexano)	J K	37.328
GaA-b (hexano)	J K L	36.177
GaA-m (hexano)	K L M	34.595
GcA-bc (hexano)	K L M	34.450
GcZ-b (hexano)	L M	30.279
GcT-b (hexano)	L M	29.848
GcA-b (hexano)	M	28.553

Extracto	Media cuadrática	Error estandar	Media
agua	62.657209	0.500716	63.2198
etanol	62.049864	0.500716	59.8634
hexano	34.073587	0.500716	35.2818

$\alpha=0.050$ $Q=3.89741$

AT12. Análisis estadístico de los extractos para fenoles totales (polifenoles).

Muestras	Subconjuntos (Tukey)	Media cuadrática
GcA-bc (agua)	A	146.64898
GaA-m (hexano)	B	129.37195
GbT-b (agua)	C	104.3754
GbT-m (etanol)	C D	100.33184
GcA-m (agua)	D	96.65588
GbT-m (hexano)	E	89.30395
GcA-b (agua)	E	84.5252
GcZ-b (agua)	F	72.39452
GbT-m (agua)	G	63.9398
GaA-b (etanol)	G	61.36663
GaA-b (agua)	G H	58.79346
GbT-b (etanol)	G H	58.42586
GcT-b (agua)	H I	55.11749
GcT-b (etanol)	H I	54.3823
GcA-m (hexano)	H I	53.64711
GaA-b (hexano)	I J	51.07393
GaA-m (agua)	J K	47.76557
GcZ-b (etanol)	K L	43.35441
GcT-b (hexano)	L	38.94325
GcA-bc (etanol)	L	38.57566
GaA-m (etanol)	M	27.91537
GcZ-b (hexano)	M N	25.70979
GcA-bc (hexano)	N O	22.11667
GbT-b (hexano)	N O	21.29863
GcA-b (hexano)	N O	20.93103
GcA-b (etanol)	O P	19.09305
GcA-m (etanol)	P	13.57911

Extracto	Media cuadrática	Error estandar	Media
agua	77.916634	0.42275296	81.1351
etanol	48.83568	0.42275296	46.336
hexano	43.662179	0.42275296	50.2663

$\alpha=0.050$ $Q=3.89741$

AT13. ANOVA anidada para antioxidantes.

Factor	gl	Suma de cuadrados	F	P
Localidad{solvente}	6	573.63	21.66	<0.0001
Especie{localidad,solvente}	18	2316.64	29.15	<0.0001
Solvente	2	9391.68	1063.66	<0.0001

AT14. ANOVA anidada para fenoles totales.

Factor	gl	Suma de cuadrados	F	P
Localidad{solvente}	6	11892.72	629.84	<0.0001
Especie{localidad,solvente}	18	61125.12	1079.06	<0.0001
Solvente	2	12008.16	1907.86	<0.0001

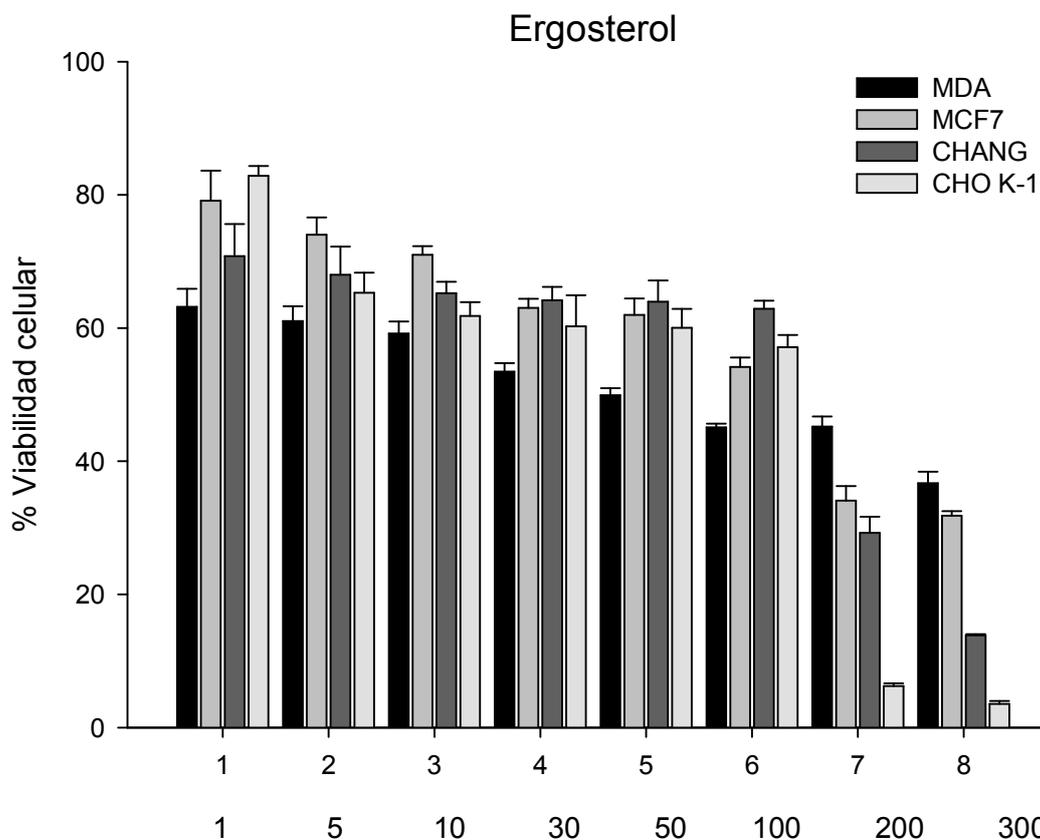
AT15. Análisis de función discriminante, en donde se muestran la correlación de las variables con las funciones discriminantes, los valores propios, significancia (P) y porcentaje de varianza (%).

Variable	FD 1	FD 2
Fenoles Tot (etanol)	-0.052	-0.481
Fenoles Tot (agua)	-0.828	0.213
Fenoles Tot (hexano)	0.274	0.351
Antiox (etanol)	0.405	-0.107
Antiox (agua)	0.039	0.261
Antiox (hexano)	0.073	-0.143
Valores propios	1472.67	388.253
% varianza	70.430	18.570
P	<0.0001	<0.0001

AT16. Análisis de la actividad antiproliferativa de los extractos hexánicos y metanólicos de *G. applanatum* y *G. curtisii* con las líneas celulares ensayadas.

Línea celular	<i>G. applanatum</i>		EC ₅₀	<i>G. curtisii</i>		EC ₅₀
	Supervivencia Máxima (%)	a EC ₅₀ (%)		Supervivencia Máxima (%)	a EC ₅₀ (%)	
CHO K-1	68 ± 2	34	145 µg/mL	67 ± 1	33.5	150 µg/mL
Chang-HeLa	64 ± 0.7	32	63 µg/mL	74 ± 4	37	64 µg/mL
MCF-7	75 ± 5	37.5	<u>54 µg/mL</u>	86 ± 3	43	<u>40 µg/mL</u>
MDA-MB231	75 ± 4	37.5	130 µg/mL	63 ± 7	31.5	99 µg/mL

Línea celular	<i>G. applanatum</i>		EC ₅₀	<i>G. curtisii</i>		EC ₅₀
	Supervivencia Máxima (%)	a EC ₅₀ (%)		Supervivencia Máxima (%)	a EC ₅₀ (%)	
CHO K-1	101 ± 1	55.5	149 µg/mL	107 ± 0.4	53.5	61 µg/mL
Chang-HeLa	90 ± 3	45	169 µg/mL	89 ± 3	44.5	106 µg/mL
MCF-7	99 ± 1	49.5	<u>186 µg/mL</u>	<u>91 ± 2</u>	45.5	<u>74 µg/mL</u>
MDA-MB231	101 ± 3	55.5	180 µg/mL	99 ± 7	49.5	121 µg/mL



AF2. Análisis comparativo de viabilidad celular en las líneas MDA-MB231, MCF-7, CHANG y CHOK-1, tratadas con ergosterol en concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 y 300 µg/mL, durante 24 horas de cultivo.

AT17. Análisis de la actividad antiproliferativa del ergosterol con las líneas celulares ensayadas.

ERGOSTEROL			
Línea celular	Supervivencia		EC ₅₀
	Máxima (%)	a EC ₅₀ (%)	
CHO K-1	83 ± 1	41.5	144 µg/mL
Chang-HeLa	71 ± 4	35.5	159 µg/mL
MCF-7	79 ± 4	39.5	<u>61 µg/mL</u>
MDA-MB231	63 ± 2	31.5	47 µg/mL

14. TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS

CONGRESOS

XX Congreso de Botánica

Actividad antioxidante de *Ganoderma curtisii* y *G. applanatum* (Polyporaceae) procedentes del estado de Hidalgo.

04 de septiembre de 2016. Ciudad de México.

Modalidad cartel.

VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental

Determinación de compuestos secundarios de dos especies de *Ganoderma* (Polyporaceae) del estado de Hidalgo, México.

15 al 18 de noviembre de 2016. Cancún, Q. R. México.

Modalidad oral.

IX Congreso Latinoamericano de Micología

Determinación de compuestos mayoritarios en *Ganoderma curtisii* y *G. applanatum* (Polyporales-basidiomycota) del estado de Hidalgo, México.

20-25 de agosto de 2017. Lima. Perú

Modalidad oral.

IX Congreso Lationamericano de Micología

Determinación de la actividad antioxidante de tres especies de *Ganoderma* (Basidiomycota), del estado de Hidalgo, México.

20-25 de agosto de 2017. Lima. Perú

Modalidad cartel

XII Congreso Nacional de Micología

Efecto citotóxico de los extractos de *Ganoderma applanatum* y *G. curtisii* en cáncer de mama.

15-19 de octubre de 2018. Xalapa, Ver. México

Modalidad oral.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Esteroles principales de *Ganoderma curtisii* y *Ganoderma applanatum* del estado de Hidalgo, México.

Revista Avances en Ciencias e Ingeniería - ISSN: 0718-8706

Av. cien. ing.: 9(1), 43-54 (Enero/Marzo, 2018)

Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México.

Revista Scientia Fungorum

Scientia Fungorum vol. 46: 37-45 (2017).