



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPALES
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Ganoderma curtisii***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

I.B.Q. Ivone Huerta Aguilar

Directora de Tesis

Dra. En Ingeniería. Ma. Guadalupe Garnica Romo

Co-Directora de Tesis

Dra. Berenice Yahuaca Juárez

Morelia, Mich., junio de 2015

DEDICATORIA

A mi hijo **Leonardo**, mi principal fuente de inspiración y motivación que con su luz ha iluminado mi vida y hace mi camino más claro.

A **Vladimir**, que ha sido el viento y las olas que impulsan mi barco, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido mi amigo y compañero inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento.

A mis padres **Mary† y Gil**, que con su amor y enseñanza sembraron en mí las virtudes necesarias para actuar con responsabilidad, dedicación y constancia en la vida.

A **Jaime Rodríguez Barrera†**, fuente inagotable de creatividad e ingenio que trabajó conmigo en el descubrimiento de los hongos, que me impulsó y ayudó a ser parte de este fantástico reino y que observa desde otra dimensión la culminación de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las facilidades otorgadas y el apoyo económico brindado para alcanzar mi meta.

A mi directora de tesis, la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo por su amable colaboración, por su apoyo y sugerencias que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mi coasesora de tesis, la Dra. Berenice Yahuaca Juárez, por su confianza y apoyo en este proyecto y quien siempre se mostró dispuesta a facilitarme los medios para alcanzar los objetivos planteados, por sus valiosos consejos y disposición para ayudarme en todo.

Mi gratitud, para quienes formaron parte de mi Comité de Tesis: Dr. Héctor E. Martínez Flores, Dr. Luis Chacón García y Dr. Jorge Molina Torres, por haber trabajado conmigo todo el tiempo necesario para concluir este trabajo de investigación.

Un agradecimiento sincero y profunda admiración al Dr. Jorge Molina Torres, quien por reiterada ocasión y de forma generosa, me abrió las puertas de su laboratorio, poniendo a disposición absoluta el equipo y el personal para llevar a cabo las cromatografías de capa fina y las cromatografías de gases. Agradezco su constante asesoría y valiosos conocimientos que siempre compartió conmigo.

Al D.C. Víctor Manuel Gómez Reyes por su valioso apoyo para realizar los estudios taxonómicos del Hongo *Ganoderma curtisii*.

A la Dra. Ruth Alfaro Cuevas Villanueva y al Dr. Raúl Cortés Martínez por su disponibilidad y apoyo para realizar el análisis de metales pesados.

A la Dra. Consuelo de Jesús Cortés Penagos por las facilidades otorgados en el laboratorio de Biotecnología M.C. Víctor M. Rodríguez A.

Al Dr. Javier Ponce Saavedra por su valiosa asesoría en el análisis estadístico.

A mis compañeros y amigos de la UMSNH y del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Químico Farmacobiología quienes indudablemente siempre tuvieron palabras de aliento y motivación hacia mi persona.

Finalmente un sincero y profundo agradecimiento a la empresa Kamuhro, Hongos Exóticos y a su Director General el Dr. Jaime H. Rodríguez Merlos por permitirme ser parte del maravilloso y misterioso universo de los hongos.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 PRODUCCIÓN DE <i>GANODERMA</i>	15
1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL HONGO <i>GANODERMA</i>	17
1.2.1 <i>Triterpenos</i>	17
1.2.2 <i>Polisacáridos</i>	20
1.2.3 <i>Compuestos Fenólicos</i>	22
1.3 PROPIEDADES MEDICINALES DEL HONGO <i>GANODERMA</i>	22
1.4 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE <i>GANODERMA</i>	24
1.5 PRODUCTOS COMERCIALES DE <i>GANODERMA</i>	24
2. TECNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS	25
2.1 COLORIMETRÍA	25
2.2. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (AAS)	26
2.3. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE ALTA EFICIENCIA (HPTLC)	27
2.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	29
2.5. ESPECTROSCOPÍA UV-VIS	30
2.6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH	31
2.7. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU PARA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34

5.1. OBJETIVO GENERAL.....	34
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1 MATERIAL DE ESTUDIO	35
6.2 REACTIVOS	35
6.3 EQUIPO	37
6.4. MÉTODOS.....	38
6.4.1 Estrategia Metodológica	38
6.4.2 Caracterización taxonómica	39
6.4.3 Caracterización fisicoquímica	39
6.4.4 Análisis químico proximal	40
6.4.5 Determinación de Metales pesados	40
6.5 SELECCIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL HONGO <i>GANODERMA CURTISII</i>	40
6.5.1 Extracción hidroalcohólica hasta agotamiento	40
6.5.2 Extracción por calentamiento directo.....	41
6.5.3 Extracción por el Método de Soxhlet	42
6.5.4 Diagrama de flujo del proceso de extracción de <i>Ganoderma</i>	43
6.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS Y ACUOSOS.	44
6.6.1 Cromatografías de capa fina de alta eficiencia HPTLC.	44
6.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de las extracciones alcohólicas... 45	
6.6.3 Evaluación del contenido de polisacáridos en el extracto acuoso por calentamiento directo y por Soxhlet y en el extracto acuoso por calentamiento directo optimizado por MSR	46
6.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE <i>GANODERMA CURTISII</i> POR EL MÉTODO DPPH48	
6.8 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO Y ETANÓLICO.....	49
7. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN ALCOHÓLICO-ACUOSA DE <i>GANODERMA CURTISII</i>.....	51
7.1 EXTRACCIÓN ALCOHÓLICA	51
7.1.1. Diagrama de flujo del proceso de extracción etanólica de <i>Ganoderma curtisii</i>	52
7.2 EXTRACCIÓN ACUOSA.....	52
7.2.1. Diagrama de flujo del proceso de extracción acuosa de <i>Ganoderma curtisii</i>	53
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
8.1. OPTIMIZACIÓN	54

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
9.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO “GANODERMA CURTISII”	55
9.1.1 <i>Caracterización Taxonómica.....</i>	55
9.1.2 <i>Caracterización Físicoquímica</i>	58
9.1.3 <i>Determinación de Metales.....</i>	60
9.2 EXTRACCIONES DE GANODERMA CURTISII.	62
9.2.1 <i>Proceso de extracción hidroalcohólica de Ganoderma curtisii hasta agotamiento</i>	62
9.2.2 <i>Extracción por calentamiento directo.....</i>	67
9.2.3 <i>Extracción por Soxhlet</i>	68
9.3 IDENTIFICACIÓN POR HPTLC DE COMPUESTOS TERPÉNICOS EN EXTRACCIONES ALCOHÓLICAS POR CALENTAMIENTO DIRECTO Y POR SOXHLET.	70
9.4 IDENTIFICACIÓN POR HPTLC DE AZÚCARES EN EXTRACCIONES ACUOSAS POR CALENTAMIENTO DIRECTO Y POR SOXHLET.	72
9.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS EXTRACCIONES ALCOHÓLICAS.	74
9.6 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN EXTRACCIONES ACUOSAS POR CALENTAMIENTO DIRECTO Y POR SOXHLET. 75	
9.6.1 <i>Identificación y cuantificación de azúcares por el método Fenol-sulfúrico</i>	77
9.7 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA DE G. CURTISII.....	79
9.7.1 <i>Cromatografía de Capa Fina de alta Eficiencia (HPTLC) de compuestos terpénicos en extracciones alcohólicas optimizadas por MSR.....</i>	86
9.7.2 <i>Compuestos identificados en las extracciones etanólicas optimizadas por MSR.</i>	87
9.8 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ACUOSA DE GANODERMA CURTISII.....	88
9.9 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO, ETANÓLICO Y POLISACÁRIDOS DE G. CURTISII.....	97
9.9.1 <i>Valores de IC₅₀ en las propiedades antioxidantes.....</i>	98
9.10 CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	99
10. CONCLUSIÓN.....	101
11. PERSPECTIVAS.....	102
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hongo <i>Ganoderma</i>	15	
Figura 2. Cultivo en aserrín y otros residuos agrícolas	16	
Figura 3. Troncos utilizados para el cultivo de <i>Ganoderma</i>	16	
Figura 4. Cultivo de <i>Ganoderma</i> en camas de troncos	16	
Figura 5. Ácido Ganodérico	18	
Figura 6. Estructuras de Triterpenos (Tomado de Yang et al., 2007)	20	
Figura 7. Estructura molecular de β -glucanos de <i>Ganoderma</i> (Modificado de www.adaptogeno.com)	21	
Figura 8. Fragmento de quitina (Tomada de Borgognoni et al., 2006).....	22	
Figura 9. Sistema Hunter y las coordenadas L, a y b.....	25	
Figura 10. Ángulo Hue	Figura 11. Chroma o saturación del color.....	26
Figura 12. Gráfico que muestra el cambio de color de DPPH de púrpura a amarillo.....	31	
Figura 13. Zona de Colecta de <i>Ganoderma</i>	35	
Figura 14. Estrategia Metodológica General.....	38	
Figura 15. Diagrama de flujo de la Extracción Hidroalcohólica hasta agotamiento	41	
Figura 16. Extracción por calentamiento directo.....	42	
Figura 17. Extracción por Soxhlet.....	42	
Figura 18. Diagrama de flujo del proceso de extracción de <i>Ganoderma</i>	43	
Figura 19. Equipo HPTLC automatizado	45	
Figura 20. Equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas por impacto electrónico.....	46	
Figura 21. Combinación y concentración de las tres extracciones acuosas	47	
Figura 22. Polisacáridos precipitados y secos	47	
Figura 23. Gráfico de Capacidad Antioxidante de extractos de <i>G. curtisii</i>	49	
Figura 24. Curva de calibración de ácido gálico	Figura 25. Tubos con diferentes concentraciones de ácido gálico	50
Figura 26. Diagrama del proceso de extracción etanólica por el método de calentamiento directo	52	

Figura 27. Diagrama del proceso de extracción acuosa de <i>Ganoderma curtisii</i> por el método de calentamiento directo.....	54
Figura 28. Píleo de <i>Ganoderma curtisii</i>	56
Figura 29. Caracteres distintivos de <i>G. curtisii</i> : a) Contexto dúplex; b) las capas resinosas;	57
Figura 30. Sistema hifal trimítico. a) hifas generativas; b) Hifas esqueléticas; c) hifas conectivas. ...	57
Figura 31. Basidiosporas de doble pared y ornamentadas.....	57
Figura 32. Trama de la cutícula himeniforme, se distinguen por las células claviformes.	58
Figura 33. Coloración hongo <i>Ganoderma</i>	59
Figura 34. Extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento.....	62
Figura 35. Curvas de absorción de extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento de <i>G. curtisii</i> . 64	
Figura 36. Valores de pH para las siete extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento.	65
Figura 37. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de.....	65
Figura 38. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de.....	66
Figura 39. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de <i>Ganoderma Curtisii</i> a 254 nm	66
Figura 40. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de <i>Ganoderma Curtisii</i> a 366 nm.	67
Figura 41. Extracciones de Alcohol y agua	67
Figura 42. pH de extracciones por Calentamiento directo.	68
Figura 43. Extracciones de Alcohol y agua por Soxhlet.....	68
Figura 44. pH de Extracciones por Soxhlet.....	69
Figura 45. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento	70
Figura 46. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento.....	71
Figura 47. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento.....	71
Figura 48. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento.....	72
Figura 49. HPTLC de las extracciones acuosas por Calentamiento.....	73
Figura 50. HPTLC de las extracciones acuosas por Calentamiento.....	74
Figura 51. Comparativo de CG/MS de extracciones por calentamiento y por Soxhlet.	75
Figura 52. Comparativo extracciones acuosas por calentamiento directo y Soxhlet.	76
Figura 53. Concentrados extracciones acuosas por calentamiento directo y por Soxhlet.....	76
Figura 54. Polisacáridos crudos precipitados y secos.	77

Figura 55. Soluciones coloreadas para curva de calibración por el método fenol-sulfúrico.....	77
Figura 56. Curva de calibración para la glucosa y ecuación de regresión lineal	78
Figura 57. Gráfica de las 13 extracciones etanólicas optimizadas por MSR y cantidad de compuestos obtenidos.....	79
Figura 58. Gráfico de Superficie de Respuesta Tiempo y Temperatura versus Rendimiento	82
Figura 59. Curvas de Contorno y rendimiento óptimo de la extracción etanólica.	83
Figura 60. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 60°C y tiempo de 120 min.....	83
Figura 61. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 65°C y tiempo de 120 min.....	84
Figura 62. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 70°C y tiempo de 120 min.....	84
Figura 63. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 77.5°C y tiempo de 180 min.....	85
Figura 64. Gráfico de Contornos extracción etanólica en los puntos óptimos de Temperatura 74°C y tiempo de 117 min	85
Figura 65. HPTLC de las extracciones alcohólicas optimizadas por MSR.....	86
Figura 66. Gráfica de las 13 extracciones acuosas optimizadas por MSR y cantidad de polisacáridos obtenidos.....	88
Figura 67. Gráficos de Contornos extracción acuosa a Temperaturas entre 80-90°C y tiempos entre 110-160 min	91
Figura 68. Gráfico de Superficie de Respuesta Tiempo y Temperatura versus Rendimiento Polisacáridos.....	92
Figura 69. Gráfico de Contornos extracción acuosa a una Temperatura de 80°C y tiempo de 90 min	92
Figura 70. Gráfico de Contornos extracción acuosa a una Temperatura de 80°C y tiempo de 160 min	93
Figura 71. Gráfico de Contornos extracción acuosa a una Temperatura de 80°C y tiempo de 180 min	93

Figura 72. Gráfico de Superficie de Respuesta de las extracciones acuosas	94
Figura 73. Localización del punto óptimo de rendimiento en el Gráfico de Superficie de Respuesta	95
Figura 74. Gráfico de Contornos extracción acuosa en los puntos óptimos de Temperatura 81°C y tiempo de 122.5 min	95
Figura 75. Correlación de Compuestos fenólicos y porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico.....	100
Figura 76. Correlación de Compuestos fenólicos y porcentaje de inhibición del extracto etanólico	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Arreglo experimental usado para las diferentes combinaciones de extracción etanólica: temperatura y tiempo de extracción.	51
Tabla 2. Arreglo experimental usado para las diferentes combinaciones de extracción acuosa: temperatura y tiempo de extracción	53
Tabla 3. Ficha taxonómica de <i>Ganoderma curtisii</i> (Berk.) Murill.....	55
Tabla 4. Resultados Tamaño de Partícula	58
Tabla 5. Resultados de Color de <i>G. curtisii</i>	59
Tabla 6. Análisis Químico Proximal	60
Tabla 7. Contenido de Metales en hongo <i>Ganoderma curtisii</i>	60
Tabla 8. Resultados de Color para las siete extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento de <i>G. curtisii</i>	63
Tabla 9. Arreglo estadístico establecido para las trece extracciones etanólicas y cantidad de compuestos obtenidos.....	79
Tabla 10. Análisis de Varianza de las extracciones etanólicas de <i>G. curtisii</i>	80
Tabla 11. Parámetros estimados de las extracciones etanólicas.....	80
Tabla 12. Análisis de los Efectos para las extracciones etanólicas de <i>G. curtisii</i>	81
Tabla 13. Valores Óptimos encontrados para la extracción etanólica de compuestos de <i>G. curtisii</i> . 82	
Tabla 14. Compuestos identificados en las extracciones etanólicas optimizadas por MSR.....	87
Tabla 15. Arreglo estadístico establecido para las trece extracciones acuosas y el rendimiento obtenido de polisacáridos crudos.	88
Tabla 16. Análisis de Varianza de las extracciones acuosas de <i>G. curtisii</i>	89
Tabla 17. Parámetros estimados de las extracciones acuosas	89
Tabla 18. Análisis de los Efectos para las extracciones acuosas de <i>G. curtisii</i>	90
Tabla 19. Valores Óptimos encontrados para la extracción de Polisacáridos de <i>G. curtisii</i>	90
Tabla 20. Resultados % de inhibición de extractos de <i>G. curtisii</i>	97
Tabla 21. Valores comparativos de porcentaje de inhibición e IC ₅₀ para extractos de <i>Ganoderma</i> ..	98
Tabla 22. Valores comparativos de GAE para extractos de <i>Ganoderma</i>	99

Tabla 23. Correlación entre % de Inhibición de los extractos de *G. curtisii* y su contenido de
Compuestos fenólicos mg GAE/g 99

RESUMEN

El hongo del género *Ganoderma* contiene componentes como polisacáridos, triterpenos y compuestos fenólicos que presentan propiedades antioxidantes. Los métodos de extracción y el solvente utilizado, influyen en la cantidad de compuestos obtenidos del hongo. El objetivo fue optimizar el proceso de extracción de *Ganoderma curtisii* colectado en la localidad de la Escalera en Michoacán. Se efectuó la caracterización fisicoquímica del material de estudio y por espectrometría de absorción atómica se comprobó la ausencia de plomo, cadmio, cobre, cromo, níquel, y arsénico. Se utilizaron dos metodologías de extracción, por calentamiento directo y por Soxhlet. Los extractos fueron analizados por HPTLC, CG/EIMS y el método fenol sulfúrico para la cuantificación de azúcares. Se estableció el método de extracción por calentamiento directo para la optimización de compuestos activos de *G. curtisii* usando un diseño central compuesto para la extracción etanólica y otro para la acuosa. Los factores de estudio fueron temperatura y tiempo de extracción y las variables de respuesta fueron rendimiento de polisacáridos y triterpenos. Se determinó que para la extracción etanólica la temperatura de 74°C durante 117 minutos es la óptima para una mayor extracción de compuestos terpénicos. La temperatura y tiempo óptimos para la extracción de polisacáridos (105 mg) fue de 81°C y 122.5 minutos. Se observó que en la extracción etanólica, la temperatura fue significativa en el rendimiento de triterpenos. Se identificaron derivados de ergostanol, ácidos grasos, azúcares, ácidos carboxílicos, ácido ganodérico A y ácido ganodérico C₂.

Se determinó la actividad antioxidante por DPPH de los extractos etanólico, hidroalcohólico y polisacáridos, presentando porcentajes de inhibición a 1 mg/ml de 90%, 89% y 83% respectivamente la cual está directamente relacionada con la concentración del extracto. Se determinaron polifenoles totales, los cuales se correlacionan con la capacidad antioxidante de los extractos.

Palabras clave: Extracción, triterpenos, polisacáridos, compuestos fenólicos, antioxidante.

ABSTRACT

The fungi of the genus *Ganoderma* contains components like triterpenes, polysaccharides and phenolic compounds having antioxidant properties. Methods of extraction and the solvent used, influence the amount of obtained compounds. The aim was to optimize the extraction of *Ganoderma curtisii* collected in the locality of La Escalera in Michoacan. Physicochemical characterization of study material was performed and atomic absorption spectrometry confirms absence of lead, cadmium, copper, chromium, nickel, and arsenic. Two methods of extraction were used by direct heating and Soxhlet. The extracts were analyzed by HPTLC, GC / EIMS and phenol sulfuric method for quantification of sugars. Extraction method by direct heating was established to optimize *G. curtisii* active compounds using a central composite design for ethanol extraction and other for aqueous extraction. Factors studied were temperature and extraction time and response variables were yield of polysaccharides and triterpenes. It was determined that for ethanol extraction temperature of 74 °C during 117 minutes was optimal for higher extraction of terpene compounds. Optimum temperature and time for extraction of polysaccharides (105 mg) were 81 °C and 122.5 minutes. It was observed that in ethanolic extraction, temperature was significant in the yield of triterpenes. Ergostanol derived compounds, fatty acids, sugars, carboxylic acids, ganoderic acid A and ganoderic acid C₂ were identified. DPPH scavenging activity percentage was determined on ethanol, hydroalcoholic and polysaccharides extracts, scavenging activity percentage at 1 mg/ml was 90%, 89% and 83% respectively, the antioxidant activity is directly related to the concentration of the extract. Total polyphenols were determined, which are correlated with the antioxidant capacity of the extract.

Keywords: Extraction, triterpenes, polysaccharides, phenolic compounds, antioxidant.

1. INTRODUCCIÓN

Por sus propiedades medicinales y nutricionales, el hongo *Ganoderma* denominado como Lingzhi, Reishi o Mannentake, ha sido usado en la medicina herbolaria tradicional desde hace aproximadamente 2000 años y su empleo se ha extendido a todo el mundo (Wachtel-Galor et al., 2004; Lindequist et al., 2005). Es un hongo basidiomiceto, poliporáceo, presenta una variada policromía en tonos que van del amarillo, ocre, anaranjado, rojo y hasta el negro; de superficie exterior brillante y textura amaderada (Figura 1). Crece en latitudes cálidas, principalmente bosques densos con alta humedad y poca luz, en árboles muertos, pinos, quercus, entre otros (Zhao et al., 1994).



Figura 1. Hongo *Ganoderma*

1.1 Producción de *Ganoderma*

La producción mundial de *Ganoderma* es de aproximadamente 6,000 toneladas anuales, más de la mitad proveniente de China (Lai et al., 2004). El hongo se obtiene de forma silvestre y por cultivo en invernaderos en sustratos lignocelulósicos (granos, aserrín, pajas de cereales y troncos) (Stamets P., 2000; Chang et al., 1999; Wasser et al., 2005; Boh et al., 2007) y corcho (Riu et al., 1997). El método de cultivo más utilizado es el aserrín suplementado (Figura 2), sin embargo, el método más eficiente es el que emplea camas de troncos de árboles de maderas duras enterrados en suelos enriquecidos, previa inoculación de micelio de *G. lucidum* (Figuras 3 y 4). Debido a que el cultivo del hongo tarda varios meses, se han desarrollado otras técnicas para obtener sus principios activos, como son el cultivo de micelio y cultivo líquido (Avtonomova et al., 2006; Sanodiya et al., 2009; Evsenko et al., 2009; Wagner et al., 2003). En México, el cultivo aún no se realiza industrialmente,

solo se tienen referencias de investigaciones sobre el cultivo del hongo realizadas por el Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas de Puebla (Tello-Salgado, 2010).



Figura 2. Cultivo en aserrín y otros residuos agrícolas



Figura 3. Troncos utilizados para el cultivo de *Ganoderma*



Figura 4. Cultivo de *Ganoderma* en camas de troncos

En Michoacán, *Ganoderma* crece de manera silvestre, se han colectado ejemplares de diferentes localidades de la zona oriente del estado, principalmente de la localidad **La Escalera**, situada en el Municipio de Charo. Es importante destacar que el cultivo silvestre de *Ganoderma* en Michoacán representa un alto potencial de comercialización del hongo, partiendo de sus propiedades bioactivas con impacto en la salud del consumidor.

1.2 Composición química y Compuestos bioactivos del Hongo *Ganoderma*

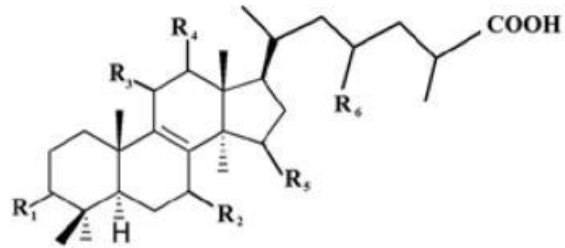
Para la mayoría de los hongos el agua constituye el 90 % de su peso. Para las especies de *Ganoderma*, representa el 75% y el 25 % restante se compone de 26 a 28 % de carbohidratos, 3-5 % de grasa cruda, fibra cruda 59 %, 7-8 % de proteína cruda y 1.8 % de minerales (Mau et al., 2001). Además, *Ganoderma* contiene una amplia variedad de componentes bioactivos tales como terpenoides, esteroides, fenoles, glicoproteínas y polisacáridos. Entre los polisacáridos destacan: la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano. Numerosos autores han demostrado que los triterpenos y polisacáridos son los principales componentes fisiológicamente activos de *Ganoderma lucidum* (Boh et al., 2007; Zhou et al., 2007).

1.2.1 Triterpenos

Los triterpenos son un grupo de compuestos farmacéuticamente activos que contribuyen a las actividades medicinales de *Ganoderma* (Yuen et al., 2005; Shi et al., 2010). Los triterpenos son un subtipo de terpeno, una clase de compuestos de origen natural, compuestos de una o más unidades de isopreno. Los terpenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se han encontrado diversos subtipos de terpenos que tienen actividad anti-inflamatoria, anti-carcinogénica, e hipolipidémica (Haralampidis et al., 2002). Los triterpenos contienen seis unidades de isopreno. Los isoprenos pueden formar cadenas lineales o plegables y formar una estructura similar a un anillo. El ácido ganodérico es un sub-tipo de triterpeno con cuatro isoprenos cíclicos y dos isoprenos lineales (Figura 5). Hay más de 140 especies de triterpenos identificadas en especies de *Ganoderma* (Yue et al., 2008).



Ganoderma lucidum
mushroom



Ganoderic Acid A: R₁=R₃=R₆=O, R₂=R₅=OH, R₄=H
 Ganoderic Acid B: R₁=R₂=OH, R₃=R₅=R₆=O, R₄=H
 Ganoderic Acid C2: R₁=R₂=R₅=OH, R₃=R₆=O, R₄=H
 Ganoderic Acid DM: R₁=R₂=O, R₃=R₄=R₅=R₆=H
 Ganoderic Acid T: R₁=R₅=R₆=O-Ac, R₂=R₃=R₄=H
 Ganoderic Acid X: R₁=OH, R₅=O-Ac, R₂=R₃=R₄=R₆=H
 Ganoderic Acid Me: R₁=R₅=O-Ac, R₂=R₃=R₄=R₆=H

Figura 5. Ácido Ganodérico

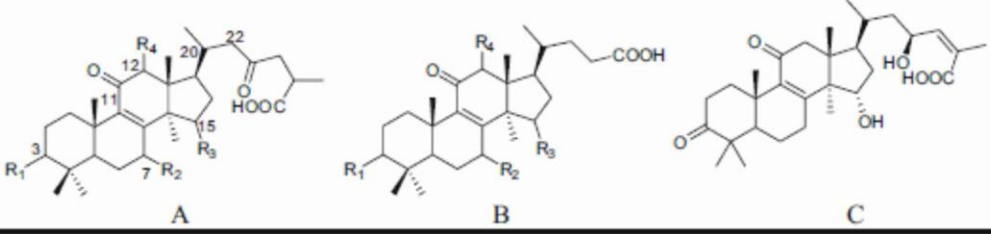
La extracción de triterpenos suele realizarse por medio de solventes como metanol, etanol, acetona, cloroformo, éter, o una mezcla de estos disolventes (Su et al., 2001).

Estudios han demostrado que extractos de triterpenos de *Ganoderma lucidum* inducen directamente la apoptosis de múltiples líneas celulares cancerosas en humanos (Yuen et al., 2005) (Figura 6). El efecto citotóxico es variable entre los diferentes subtipos de triterpenos. Algunas subespecies de triterpenos han mostrado efectos citotóxicos a bajas concentraciones en varias líneas celulares cancerosas de humanos, estos triterpenos incluyen:

1. **Ácido Ganodérico T:** es el ácido triterpénico más abundante encontrado en *Ganoderma lucidum* y ha demostrado efectos anticancerígenos significativos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Chen et al, 2010; Tang et al., 2006; Xu et al., 2010).
2. **Ácido Ganodérico A:** ha demostrado efectos en la supresión del crecimiento y la invasión de células de cáncer de mama altamente invasivas a través de regulación a la baja de la expresión de la quinasa dependiente de ciclina 4 que regula la progresión de la fase G1 del ciclo celular, y a través de la supresión de la secreción de tipo uroquinasa activador del plasminógeno que está implicada en la invasión tumoral y la metástasis de células cancerosas (Jiang et al., 2008).

3. **Ácido Ganodérico D:** Ha demostrado unirse a la proteína 14-3-3 ζ , esta unión contribuye a la apoptosis observada en las células HeLa (Yue et al., 2008).
4. **Ganoderiol F (GA-F):** es un terpeno tetracíclico encontrado en especies de *Ganoderma* (Chang et al., 2006; Min et. al., 2000). GA-F ha mostrado citotoxicidad *in vitro* contra el carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), Sarcoma Meth-A, Sarcoma 180 y Líneas celulares T-47D (cáncer de pecho) (Min et. al., 2000; Gao et al., 2002). Además el efecto antitumoral de GA-F ha sido demostrado *in vivo* en ratas implantadas con células infectadas de LLC (Gao et al 2006).

Otros triterpenos aislados de *G. lucidum* han mostrado citotoxicidad en las siguientes líneas celulares cancerosas de humanos: P388, HeLa, BEL-7402, y SGC-7901 (Guan et al., 2008).



No.	Compound name	Type	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Double bond	MW
1	12-hydroxyganoderic acid C ₂	A	β-OH	β-OH	α-OH	OH	–	534
2	Ganoderic acid C ₂	A	β-OH	β-OH	α-OH	H	–	518
3	Ganolucidic acid B	A	β-OH	H	α-OH	H	–	502
4	Lucidenic acid N	B	β-OH	β-OH	=O	H	–	460
5	Ganoderic acid C ₅	A	β-OH	=O	=O	β-OH	–	530
6	3?-hydroxy-4,4,14-trimethyl-7,11,15-trioxochol-8-en-24-oic acid	B	β-OH	=O	=O	H	–	458
7	Ganoderic acid G	A	β-OH	β-OH	=O	β-OH	–	532
8	Ganoderenic acid B	A	β-OH	β-OH	=O	H	Δ _{20,22}	514
9	Ganoderic acid B	A	β-OH	β-OH	=O	H	–	516
10	Lucidenic acid E	B	β-OH	=O	=O	β-OAc	–	516
11	Ganoderic acid AM ₁	A	β-OH	=O	=O	H	–	514
12	Ganoderenic acid K	A	β-OH	β-OH	=O	β-OAc	Δ _{20,22}	572
13	Ganoderic acid K	A	β-OH	β-OH	=O	β-OAc	–	574
14	7,15-dihydroxy-4,4,14-trimethyl-3,11-dioxochol-8-en-24-oic acid	B	=O	OH	OH	H	–	460
15	Elfvigic acid A	A	=O	=O	β-OH	α-OH	Δ _{20,22}	528
16	Ganoderic acid A	A	=O	β-OH	α-OH	H	–	516
17	Ganoderic acid H	A	β-OH	=O	=O	β-OAc	–	572
18	12,15-bis(acetyloxy)-3-hydroxy-7,11,23-trioxo-lanost-8-en-26-oic acid	A	OH	=O	OAc	OAc	–	616
19	Ganolucidic acid A	A	=O	H	α-OH	H	–	500
20	12-hydroxy-3,7,11,15,23-pentaoxo-lanost-8-en-26-oic acid	A	=O	=O	=O	OH	–	528
21	Lucidenic acid A	B	=O	β-OH	=O	H	–	458
22	12-hydroxyganoderic acid D	A	=O	β-OH	=O	OH	–	530
23	Ganoderenic acid D	A	=O	β-OH	=O	H	Δ _{20,22}	512
24	Lucidenic acid F	B	=O	=O	=O	H	–	456
25	Ganoderic acid D	A	=O	β-OH	=O	H	–	514
26	Lucidenic acid D	B	=O	=O	=O	β-OAc	–	514
27	Ganoderic acid F	A	=O	=O	=O	H	–	512
28	12-acetoxylanoderic acid D	A	=O	β-OH	=O	OAc	–	572
29	3-acetylganoderic acid H	A	β-OAc	=O	=O	β-OAc	–	614
30	Ganolucidic acid D	C	–	–	–	–	–	500
31	12-acetoxylanoderic acid F	A	=O	=O	=O	β-OAc	–	570
32	Ganoderic acid J	A	=O	=O	α-OH	H	–	514

Figura 6. Estructuras de Triterpenos (Tomado de Yang et al., 2007)

1.2.2 Polisacáridos

Los polisacáridos son moléculas de azúcar de cadena larga unidos por enlaces glucosídicos. Varios tipos de polisacáridos con pesos moleculares que van de 4×10^5 a 1×10^6 Da, se han identificado en *Ganoderma*, sobre todo en el cuerpo fructífero y micelio, y algunos han sido encontrados en las esporas (Sanodiya et al., 2009). Entre los polisacáridos destacan: el glucano y el manano o el galactomanano.

El análisis estructural muestra que los polisacáridos de *Ganoderma lucidum* son heteropolímeros (Chan et al., 2007). La glucosa forma la mayor parte de las moléculas de polisacáridos, junto con la xilosa, manosa, galactosa, ribosa, ramnosa, arabinosa, ácido D-galacturónico y ácido D-glucurónico en diferentes conformaciones. Se formuló la hipótesis de que los polisacáridos extraídos de diferentes partes de *Ganoderma lucidum* inducen respuestas inmunes en el organismo (Chan et al., 2007). Las diferentes conformaciones de ramificación y características de solubilidad afectan a las propiedades antitumorales de estos polisacáridos (Sone et al., 1985). Se sabe que los β -D-glucanos con enlaces en (1-3) -, (1-4) - y (1-6) - β -D (Figura 7) tienen una potencia anti-tumoral fuerte y mejor absorción que otros polisacáridos en *Ganoderma* (Sone et al., 1985).

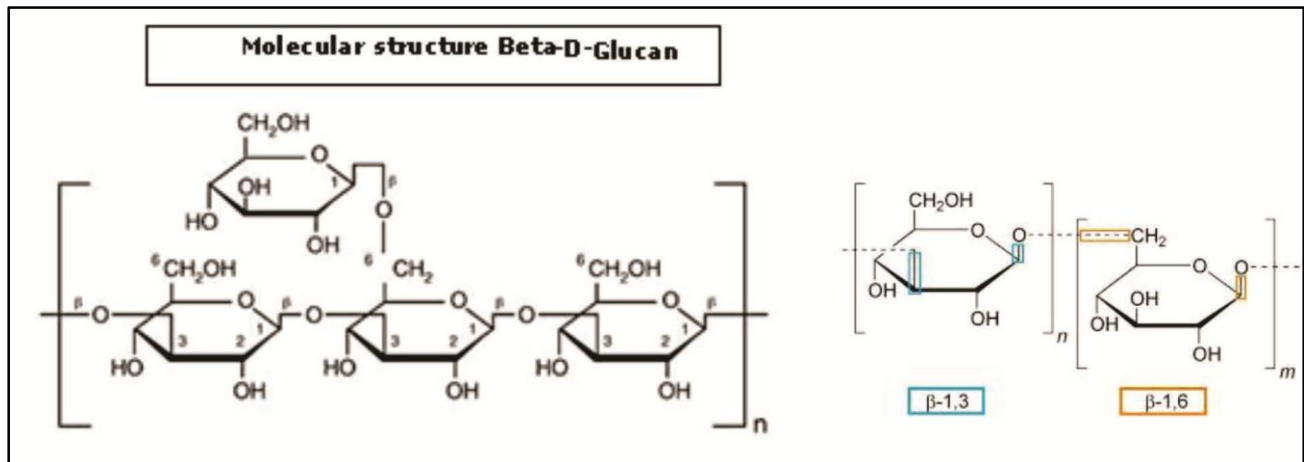


Figura 7. Estructura molecular de β -glucanos de *Ganoderma* (Modificado de www.adaptogeno.com)

Junto con la alta concentración de polisacáridos de alto peso molecular, el hongo también se compone de una matriz del polisacárido quitina (Figura 8), que es indigerible y es en parte responsable de la dureza física del hongo (Upton, 2000).

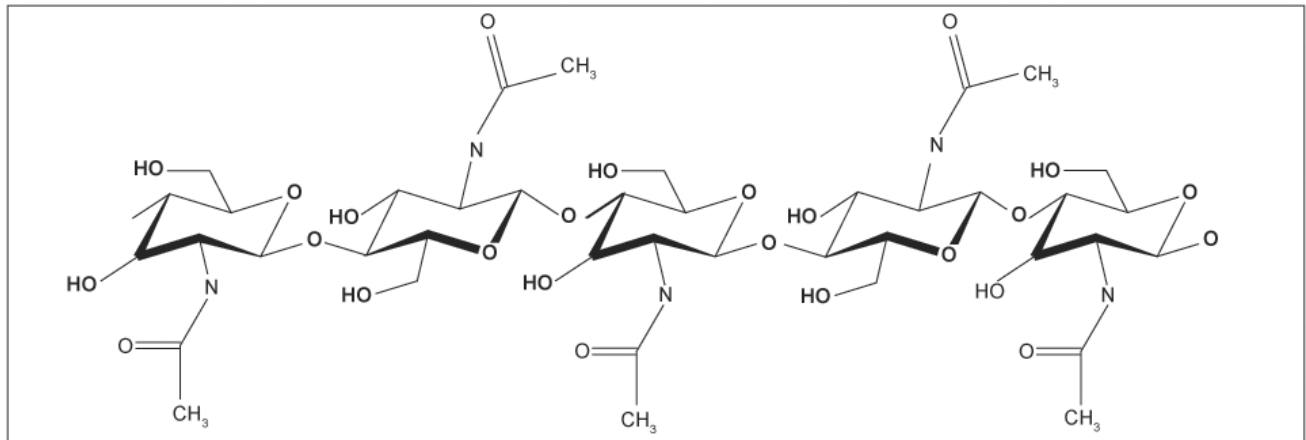


Figura 8. Fragmento de quitina (Tomada de Borgognoni et al., 2006)

1.2.3 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos entre los organismos vivos, especialmente en las plantas donde desempeñan un papel importante en la respuesta a agentes patógenos, tienen actividad antibacteriana y antiparasitaria, algunas veces altamente específica (Del Signore et al., 1997). Tales compuestos tienen uno o más anillos aromáticos, con uno o más grupos hidroxilo; se pueden encontrar en forma de moléculas simples (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) o como compuestos altamente polimerizados (lignina, melanina, taninos) y la mayoría de sus efectos biológicos se han atribuido a su actividad antioxidante (Barros et al., 2009). A pesar de que su presencia ha sido reportada en muchas especies de macromicetos comestibles y no comestibles, estos compuestos han sido poco estudiados en el género *Ganoderma*. Se ha informado que los polifenoles son los principales componentes antioxidantes en extractos acuosos de *G. lucidum* (63.51 mg GAE/g extracto) y de *G. tsugae* (24,0 a 35,6 mg / g) (Mau et al., 2005), estos valores son superiores a los reportados para otros macromicetos como *Lentinula edodes* (14.70 mg GAE/g extracto), *Pleurotus eryngii* (20.95 mg GAE/g extracto) y *Volvariella volvaceae* (20.88 mg GAE/g extracto) (Noorlidah et al, 2012).

1.3 Propiedades Medicinales del Hongo *Ganoderma*

Entre las propiedades del hongo destacan las **anticancerosas** (Gordan et al., 2011; Furusawa et al., 1992; Huang et al., 2010; Lin et al., 2011), **inmunomoduladoras** (Weng et al., 2011; Bao et al.,

2001), **antiinflamatorias** (Ko et al., 2008; Ho et al., 2007; Li et al., 2007), **hipoglucemiantes** (Teng et al., 2012; Seto et al., 2009; Hikino et al., 1985), **hipolipemiantes** (Kim et al., 2010; Berger et al., 2004; Olarewaju et al., 2010) y **hepatoprotectoras** (Li, Yang et al., 2006, Li Y, Luang et al., 2006; Hirotsu et al., 1986). Hay algunos informes realizados en China, Japón, Polonia, India y Portugal, en relación con las propiedades antioxidantes de *G. lucidum*, tanto de extractos metanólicos (Mau et al., 2002) y acuosos (Lin et al. 1995), así como también de sus polisacáridos (Jia et al. 2009; Liu et al. 2010; Kozarski et al. 2011) y compuestos fenólicos (Kim et al. 2008, Ferreira et al. 2009).

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno están relacionados con la patofisiología de una amplia gama de enfermedades. El daño oxidativo al ADN es capaz de desencadenar la carcinogénesis (Ajith et al. 2007). Se ha sugerido que las actividades antitumorales e inmunomoduladoras de los polisacáridos están en gran medida relacionadas con sus propiedades antioxidantes (Russell et al. 2006) y que estas se deben a la concentración de grupos hidroxilo disponibles (Ker et al. 2005).

Algunos reportes sobre los principios aislados de extractos de *Ganoderma* y su actividad farmacológica son: triterpenos, se asocian con los efectos anticancerígenos (Min et al., 2000; Yue et al., 2008; Lin et al., 2003), polisacáridos (Miyazaki et al., 1981; Sone et al., 1985; Shao et al., 2004; Lin et al., 2005; Kuo et al., 2006; Gao et al., 2003) o proteínas inmunomoduladoras (Lin et al., 2005; Lin et al., 1997) con mecanismos que involucran la inhibición de la DNA polimerasa (Mizushima et al., 1998), inhibición de la modificación post-traducción de la oncoproteína Ras (Lee et al., 1998) o la estimulación de la producción de citoquinas (Wang et al., 1997). Inhibición de la proliferación y el comportamiento invasivo de las células de cáncer de mama por la supresión de la secreción del activador de plasminógeno dependiente de uroquinasa (uPA) (Sliva et al., 2002; Slivova et al., 2004; Jiang et al., 2004), inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis de las células de cáncer de mama y próstata a través de la regulación de la expresión de p21 y Bax (Hu et al., 2002,; Jiang et al., 2004); Entre otros efectos, *G. lucidum* puede incrementar la capacidad plasmática antioxidante (Wachtel-Galor et al., 2004a; Wachtel-Galor et al., 2004b) y aumentar la respuesta inmune en pacientes con cáncer avanzado (Gao et al., 2003).

1.4 Extracción de los compuestos bioactivos de *Ganoderma*

Existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición química del hongo dependiendo de la especie o cepa, las condiciones de cultivo, así como de los diversos métodos de producción empleados para su procesamiento (Wasser et al., 1999; Stamets, P., 2000; Hobbs Ch., 1995; Mizuno et al., 1995; Mizuno et al., 1997; McKenna et al., 2002). El procesamiento para la comercialización de *G. lucidum* puede modificar la cantidad de cada uno de sus componentes y diferir entre los productos naturales y comerciales. Las condiciones del proceso de extracción de los componentes de *Ganoderma* incrementa significativamente la cantidad de proteínas y carbohidratos mientras que la fibra cruda disminuye (Wasser et al., 2005). Un estudio sobre 11 muestras seleccionadas al azar de productos comerciales de *Ganoderma* a las que se les evaluaron los principales componentes activos (triterpenos y polisacáridos) muestran que el contenido de triterpenos varía de trazas hasta 7.8% y el de polisacáridos de 1.1-5.8% (Chang et al., 2008).

A la fecha, numerosos métodos de extracción se han desarrollado con el objetivo de obtener extractos con mayores rendimientos y menores costos. Tal es el caso de la extracción con disolventes orgánicos, como etanol, cloroformo, hexano y acetona (Liyan et. al. 2010; Jianguo et al., 2009; Ruhan et al., 2008; Su et al., 2001).

En general, la mayoría de los polisacáridos se extraen con agua y precipitación con alcohol (Zhou et al., 2012; Huang et al., 2010). La solubilidad y la eficacia de la extracción en agua depende del peso molecular del polisacárido y la temperatura del agua; polisacáridos con peso molecular bajo extraídos utilizando agua caliente han mostrado un incremento en la eficiencia del método (Gao et al., 2003). El agua ha demostrado ser capaz de extraer diferentes clases de compuestos en función de la temperatura utilizada (Ruhan et al., 2008; Sheng-quan et al., 2010; Yi-Wei et al., 2004).

1.5 Productos comerciales de *Ganoderma*

Una gran variedad comercial de productos con *Ganoderma* se suelen encontrar en herbolarios, farmacias o tiendas de complementos nutricionales en forma de polvos, extractos, suplementos nutricionales, tés, cafés y comidas funcionales. La forma más habitual de comercializarlo, es en cápsulas o tabletas de polvo de hongo deshidratado, esporas, extracto secos, alcohólicos o acuosos. El polvo del hongo se utiliza también para infusiones como té, café, sopas y bebidas. El *Ganoderma*

se prepara tradicionalmente usando el fruto fresco o seco cortado fino o pulverizado, el cual se hierve en agua. También se utilizan los extractos alcohólicos con varios efectos medicinales, incluyendo propiedades antivirales (Lindequist et al., 2005). Según la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (2001) un “Elixir” es una solución hidroalcohólica que contiene el o los principios activos y aditivos, su contenido de alcohol puede ser de 5 al 18%. Comercialmente se encuentran productos de este tipo, como son: Reishi (Healthyvillage de EUA, Host Defense® Reishi Extract (Fungi Perfecti de EUA), *Ganoderma lucidum* extracto líquido (Harbin Yeekong Herb Inc. De China), Reyshen (Megasalud Internacional de México), entre otros productos.

2. TECNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS

2.1 COLORIMETRÍA

Hunter L, a, b y CIE 1976 $L^* a^* b^*$ (CIELAB) son escalas de color basadas en la Teoría de los colores complementarios. Esta teoría asume que los receptores en el ojo humano perciben el color como los siguientes tres parámetros de opuestos:

L representa la luminosidad de color (L^* , $L^*=0$ rendimientos negro y $L^*=100$ indica blanca), **a** su posición entre rojo y verde (a^* , valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y **b** su posición entre amarillo y azul (b^* , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo) (Hunterlab, 2012)(Figura 9).

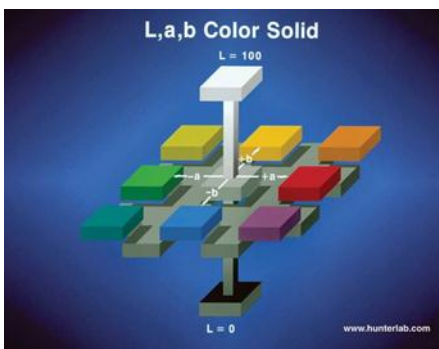


Figura 9. Sistema Hunter y las coordenadas L, a y b.

Una medida objetiva de color se logra con tres sensaciones o atributos psicométricos que son: el tono, la luminosidad y la saturación. El tono o matiz, puede ser calculado a través del °Hue y este valor se obtiene por medio de las ecuaciones 1 y 2 (Figuras 10 y 11).

$$^{\circ}\text{Hue} = \arctan \left(\frac{b}{a} \right)$$

Ecuación 1. Cuando $a \geq 0$

$$^{\circ}\text{Hue} = \arctan \left(\frac{b}{a} \right) + 180$$

Ecuación 2. Cuando $a \leq 0$

La saturación o pureza, describe el grado o la intensidad con la que un color se separa del gris neutro y se acerca a un color puro del espectro (Figura 11), este valor se conoce como Chroma y se calcula para el material de estudio a través de la Ecuación 3.

$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Ecuación 3

La Luminosidad o brillo, L, permite clasificar el color como claro u oscuro, equivalente a una escala de grises que va desde el blanco máxima luminosidad 100, hasta el negro mínima luminosidad 0, (Figura 11).

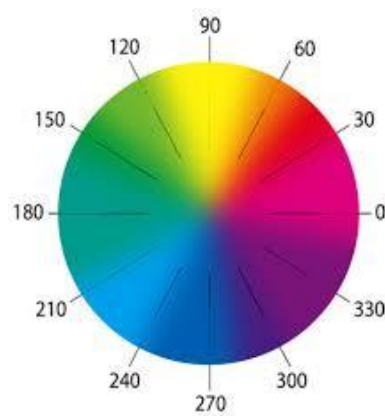


Figura 10. Ángulo Hue

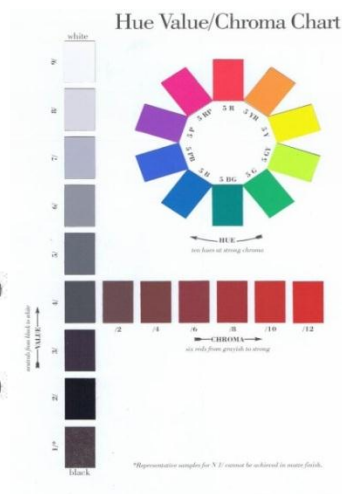


Figura 11. Chroma o saturación del color

2.2. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (AAS)

La absorción de la luz por medio de átomos brinda una herramienta analítica poderosa para los análisis cuantitativos y cualitativos. La espectroscopía de absorción atómica (AAS) se basa en el

principio que los átomos libres en estado fundamental pueden absorber la luz a una cierta longitud de onda. La absorción es específica, por lo que cada elemento absorbe a longitudes de onda únicas. AAS es una técnica analítica aplicable al análisis de trazas de elementos metálicos en minerales, muestras biológicas, metalúrgicas, farmacéuticas, aguas, alimentos y de medio ambiente.

La fuente más común que proporciona la luz que absorben los átomos para las mediciones, es la lámpara de cátodo hueco. Consiste en un cilindro de vidrio cerrado, relleno con un gas inerte (Ar, Ne). En su interior se ubica el cátodo fabricado del elemento que se analizará y un ánodo de tungsteno, el área por donde sale la luz que emite el cátodo es de cuarzo.

Se necesita calor para gasificar la muestra. El calor se genera desde una llama u horno de grafito. AAS por llama puede solamente analizar soluciones, mientras que AAS con horno puede analizar soluciones, hidrogeles y muestras sólidas. Un atomizador de llama consiste en un nebulizador el cual transforma la muestra en un aerosol que alimenta el quemador.

Un atomizador electrotérmico brinda alta sensibilidad porque atomiza el 100% de la muestra. La atomización ocurre en un horno cilíndrico de grafito abierto de ambos lados y con un hueco central para la introducción de muestras. Se utilizan dos corrientes de gas inerte con presión positiva que evitan que el aire entre en el horno y permiten extraer los vapores generados por la combustión de la muestra. El gas mayormente usado es el argón.

El monocromador cumple la función de aislar las líneas espectrales no deseadas, de la longitud de onda seleccionada para el análisis. Un fotomultiplicador convierte la luz en señales eléctricas.

2.3. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE ALTA EFICIENCIA (HPTLC)

Entre las herramientas analíticas modernas la cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC) es un poderoso método analítico adecuado para los análisis cualitativos y cuantitativos. En la actualidad, la HPTLC está jugando un papel importante en el análisis de compuestos, sin entrar en competencia con la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) sino más bien como un método complementario. Una de las principales diferencias entre las dos técnicas es el uso de fases invertidas en la HPLC en comparación con la sílica gel sin modificar que es utilizada en HPTLC,

resultando en cromatografía de partición y cromatografía de adsorción respectivamente (Attimarad et al., 2011).

La principal diferencia con la cromatografía de capa fina (TLC) es el empleo de placas de mayor calidad con partículas de menor tamaño en la fase estacionaria lo que permite una mejor resolución (Reich, 2005).

A diferencia de otros métodos, la HPTLC produce complejos cromatogramas visibles y la información sobre toda la muestra está disponible a simple vista. Múltiples muestras se ven simultáneamente. Así que las muestras de referencia y de prueba se pueden comparar para su identificación. Varios cromatogramas pueden ser comparados directamente, incluso de diferentes placas. Además de los cromatogramas visibles, también están disponibles los picos analógicos de datos a partir del cromatograma. Estos se pueden evaluar, ya sea por el software de imagen basada en VideoScan o mediante el escaneo de densitometría con escáner para TLC que se basa en la medición de la absorción y / o fluorescencia de las sustancias en la placa. La HPTLC es una técnica en la que los pasos subsiguientes son relativamente independientes, lo que permite el tratamiento paralelo de múltiples muestras durante la cromatografía, la derivatización y la detección. (Chandra and Kant, 2010)

Características principales de la HPTLC

1. Procesamiento simultáneo de la muestra y el estándar - mejor precisión analítica y menor necesidad de exactitud del patrón interno.
2. Varios analistas trabajan simultáneamente.
3. Menores tiempos de análisis y menor costo por análisis.
4. Bajo costo de mantenimiento.
5. Preparación de muestras sencillo - manejo de muestras de diferente naturaleza.
6. No se requiere de un tratamiento previo para disolventes como la filtración y la desgasificación.
7. Bajo consumo de fase móvil por muestra.
8. Ninguna interferencia con el análisis anterior – Se utilizan fases estacionarias y móviles nuevas para cada análisis – por lo que no hay contaminación.
9. Detección visual posible.

2.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Esta técnica permite el análisis rápido y exacto de gases, vapores líquidos; permite identificar los componentes individuales de las mezclas gaseosas. Iniciada a finales de 1952, se ha desarrollado notablemente en separación, identificación y determinación de compuestos volátiles (gases y líquidos) de puntos de ebullición de hasta 350-400°C. El método tiene las ventajas de ser sensible, rápido y sencillo, y si se maneja con suficiente cuidado, suministra información cuantitativa exacta con cantidades muy pequeñas de muestra.

En cromatografía de gases (GC) la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de un fase móvil de un gas inerte a diferencia de los otros tipo de cromatografía, la fase móvil no interaccionan con la moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía Gas-Sólido (GCS) y la cromatografía gas líquido (GLC). La cromatografía gas líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (GC).

La cromatografía de gases es una técnica separativa que permite la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (Gas Chromatography) y MS (Mass Spectrometry) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Skoog, 1998).

2.5. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La base de la espectroscopia Visible y Ultravioleta consiste en medir la intensidad del color (o de la radiación absorbida en UV) a una longitud de onda específica comparándola con otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Para tener esta relación se emplea la Ley de Beer, que establece que para una misma especie absorbente en una celda de espesor constante, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración.

La coloración de la solución se debe a la especie absorbente y esta coloración puede ser natural o inducida. La coloración natural puede ser la base de la cuantificación de una especie, como por ejemplo: la clorofila en ciertas plantas, los complejos metálicos que se encuentran presentes en solución acuosa, como son los iones de Cobre (II), Manganeso (VII), Cobalto (III), etc. (Skoog, 1998). Las técnicas analíticas UV-Visible han recibido gran aceptación debido, entre otras a las siguientes razones:

1. Amplio campo de aplicación: Como ya se ha mencionado, las técnicas espectroscópicas UV-Vis., son ampliamente empleadas ya que son muchas las especies que son activas en el Visible, y muchas más las que con un tratamiento adecuado son capaces de formar especies coloridas. Lo mismo puede decirse de la espectroscopia UV.
2. Selectividad adecuada: Aunque no es muy común si es posible tener interferencias en UV-Visible. Cuando esto ocurre, es posible emplear los métodos para análisis de multicomponentes. Otra alternativa es aislar el analito de la interferencia, o separa la interferencia misma.
3. Buena Exactitud y Precisión: En estas técnicas espectroscópicas es normal tener errores relativos del 1 al 3 %, por lo cual se puede considerar que se tendrán resultados analíticos con un mínimo de incertidumbre si se procede en la forma correcta.
4. Facilidad y Conveniencia: Aunque existen instrumentos altamente sofisticados acoplados a computadoras y con sistemas ópticos y electrónicos de alta precisión, es posible obtener resultados

muy aceptables para análisis de rutina, con instrumentos o espectrofotómetros de los más sencillos en el mercado, a un costo muy accesible.

2.6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH

Existen muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy usado se basa en la estabilidad del radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 517 nm (Molyneux 2004). Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color (cambia a coloración amarillo) y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (Figura 12). El parámetro IC₅₀ que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método.

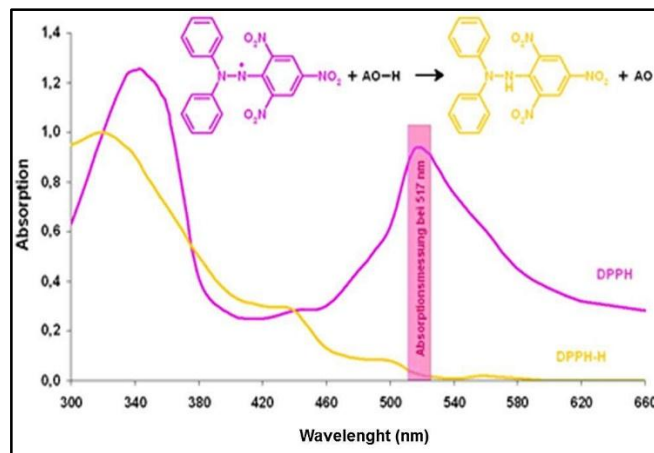


Figura 12. Gráfico que muestra el cambio de color de DPPH de púrpura a amarillo cuando se expone a una sustancia antioxidante. (Tomado de Mendoza, et al. 2013)

2.7. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU PARA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico y fosfotúngstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en

óxidos cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

3. JUSTIFICACIÓN

La extracción de compuestos bioactivos es un proceso importante para su aplicación en la industria y en la investigación y el desarrollo, y esto ha llevado a la publicación en los últimos años de numerosos trabajos de investigación sobre la tecnología para la extracción de compuestos bioactivos de plantas y hongos. Varios métodos han sido desarrollados para extraer los compuestos bioactivos con propiedades medicinales de cuerpos fructíferos del hongo del género *Ganoderma* (Mizuno, 1999). El extracto del hongo *Ganoderma curtisii* colectado en Michoacán, se ha comercializado en México desde hace algunos años. Sin embargo no existen a la fecha publicaciones en relación a la actividad biológica ni a los componentes bioquímicos de esta especie y particularmente de las producidas en el estado de Michoacán. La rica composición de elementos de *Ganoderma*, como los polisacáridos, triterpenos y compuestos fenólicos, entre otros, es la que explica la gran variedad de efectos saludables y curativos que se le atribuye al hongo del género *Ganoderma*.

La cantidad y el tipo de compuestos bioactivos disponibles en esta especie están relacionados con las condiciones del proceso de extracción, por lo que es importante establecer un método que permita optimizar dicho proceso en función de sus principios bioactivos y la cantidad de estos.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una técnica útil para estudios de optimización. La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para el modelado y análisis de los problemas en los que una respuesta de interés es influenciada por diversas variables y el objetivo es optimizar esta respuesta (Montgomery, 2005).

4. HIPÓTESIS

Optimizando las variables tiempo y temperatura se incrementará el rendimiento de triterpenos y polisacáridos en el proceso de extracción de *Ganoderma curtisii* utilizando como herramienta la metodología de superficie de respuesta.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Optimizar el proceso de extracción del hongo *Ganoderma curtisii* colectado en Michoacán, en función del mayor rendimiento en polisacáridos y triterpenos.

5.2. Objetivos Específicos

1. Hacer la determinación taxonómica del hongo *Ganoderma curtisii* colectado en la localidad de La Escalera en el estado de Michoacán.
2. Hacer la determinación fisicoquímica y evaluación de metales pesados del hongo *Ganoderma curtisii* seco y molido.
3. Seleccionar la metodología de extracción, que represente el mayor rendimiento de polisacáridos y triterpenos de *Ganoderma curtisii*.
4. Optimizar el proceso de extracción de polisacáridos y triterpenos del hongo *Ganoderma curtisii*.
5. Determinar compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante del extracto de *Ganoderma curtisii*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material de estudio

El hongo *Ganoderma* fue proporcionado por la empresa Kamuhro, colectado en la comunidad de La Escalera Municipio de Charo, Michoacán. **La Escalera** se ubica a 1721 msnm, sus coordenadas geográficas son Latitud Norte: 19° 36' 09", Longitud Oeste:- 101° 01' 05" (figura 13).



Figura 13. Zona de Colecta de *Ganoderma*

El hongo se limpió y se deshidrató en secador solar a una temperatura ambiente promedio de 21.5°C, alcanzando una temperatura máxima en deshidratador de 52°C durante 8 h. Posteriormente el hongo se molió en un molino de martillos para su posterior análisis.

6.2 Reactivos

- Ácido ascórbico **JT Baker**
- Ácido clorhídrico 0.5 M **JT Baker**
- Acido gálico **Aldrich**
- Ácido nítrico (HNO₃) de alta pureza **JT Baker**
- Ácido perclórico (HClO₄) de alta pureza **JT Baker**
- Ácido sulfúrico **Merck**
- Agua purificada **CIEL**

- Agua desionizada
- Agua destilada
- Alcohol etílico absoluto **Baker**
- Alcohol etílico 96% **ATZA**
- BSTFA (bis-trimetilsilyl-trifluoroacetamida) **Sigma-Aldrich**
- Carbonato de sodio **JT Baker**
- Cloroformo **JT Baker**
- Diclorometano **JT Baker**
- Estándares de azúcares: D-Glucosa, D-Manosa y D-Xilosa. **Sigma-Aldrich**
- Estándar de Ergosterol **Santa Cruz Biotech**
- Eter de petróleo **Merck**
- Fenol **Golden Bell**
- Glucosa en polvo **JT Baker**
- Hexano **JT Baker**
- Hidroxido de sodio NaOH **JT Baker**
- Isooctano. **Merck**
- Metanol **JT Baker**
- n-octanol **JT Baker**
- Oxido de mercurio HgO **JT Baker**
- Piridina **Sigma-Aldrich**
- Reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) **Aldrich**
- Reactivo Folín-Ciocalteau. **Merck**
- Rojo de metilo como indicador **Meyer**
- Soluciones reguladoras de pH 4 y pH 7 **JT Baker**
- Sulfato de sodio Na₂SO₄ concentrado **BIO RAD**
- Tiosulfato de sodio Na₂SO₃ **JT Baker**
- Vainillina **Sigma**

6.3 Equipo

- Balanza analítica marca Sartorius modelo BL 120S.
- Bomba de vacío marca Siemens.
- Centrífuga marca Centrificient IV.
- Colorímetro de Reflectancia Hunter Lab marca Color Flex®.
- Cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 7890A GC series, equipado con inyector automático (7693 Autosampler) y con una columna J &W DB-1MS de 60 m x 250 µm de diámetro x 0.25 µm de espesor de la fase estacionaria compuesta por 100% de dimetilpolisiloxano acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por impacto electrónico y separación por cuadrupolo EIMSD 5975C Inert XL MSD Triple Axis Detector, Agilent Technologies.
- Equipo de calentamiento múltiple para extracciones Soxhlet, marca NOVATECH modelo VARY HEAT 125*100*30.
- Equipo HPTLC automatizado marca CAMAG que incluye un despachador automático de muestra TLC 4 (ATS 4), cámara de desarrollo automática (ADC 2) y una cámara de visualización TLC controlada por computadora.
- Espectrofotómetro marca Espectro Genesys 10 S UV Vis Thermo Scientific.
- Espectrómetro de absorción atómica marca PerkinElmer modelo AAnalyst 200.
- Estufa de Incubación marca Felisa.
- Manta de Calentamiento para matraz de 3000 ml marca EVEL, modelo MC-3000.
- Microscopio óptico Carl Zeiss, marca Axiostar.
- Mufla marca Felisa modelo Fe-363.
- Plancha de Calentamiento con agitación marca IKA modelo C-MAG HS 7.
- Potenciómetro marca CORNING HS7.

6.4. Métodos

6.4.1 Estrategia Metodológica

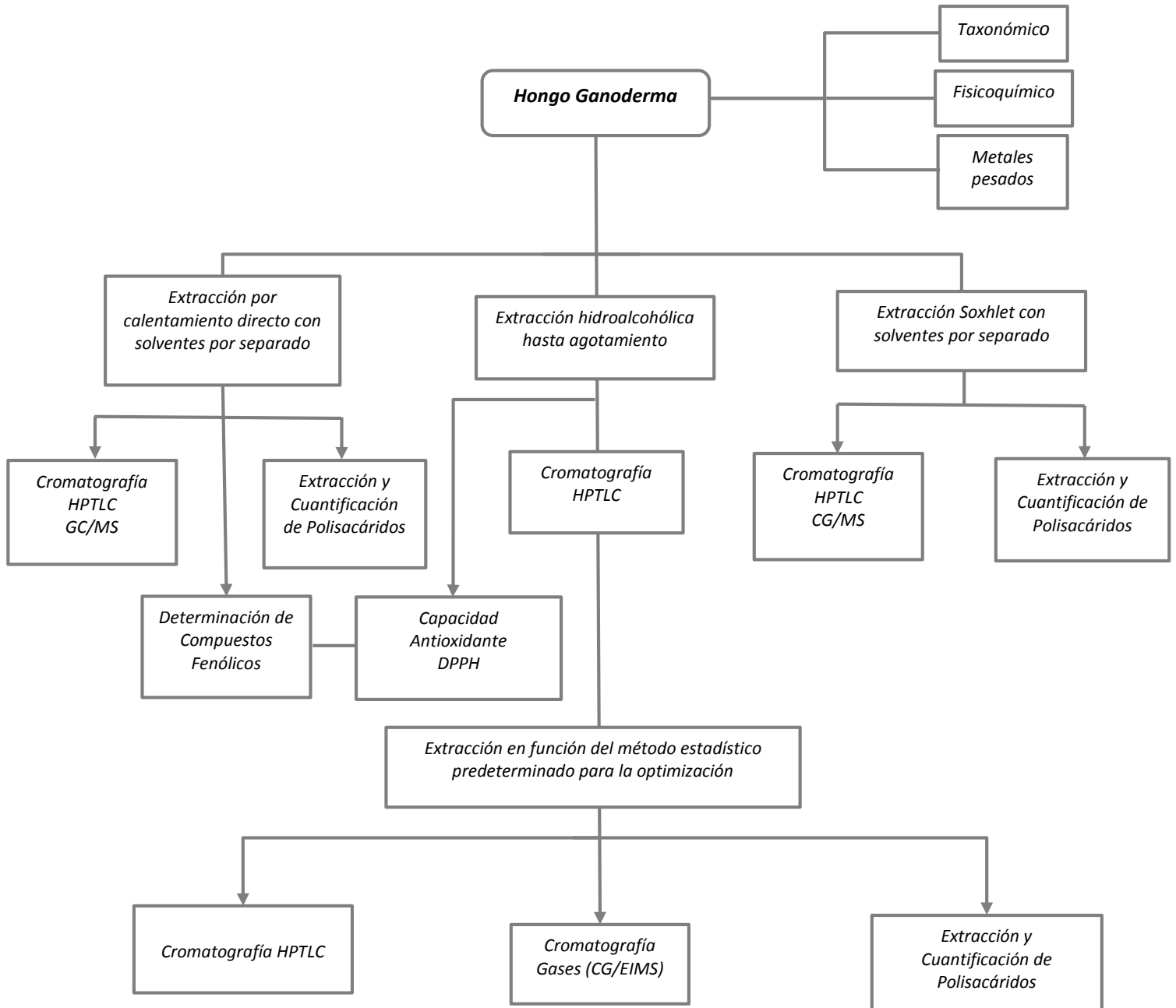


Figura 14. Estrategia Metodológica General

6.4.2 Caracterización taxonómica

La caracterización taxonómica se realizó con apoyo del EBUM (Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana) en donde se depositaron 2 ejemplares del hongo *Ganoderma curtisii* como referencia. Se desarrolló una memoria descriptiva del material de estudio.

6.4.3 Caracterización fisicoquímica

La caracterización de la materia prima se realizó en el hongo seco y molido y consistió en las siguientes determinaciones:

6.4.3.1 Tamaño de partícula.

El tamaño de partícula se determinó mediante el método por tamizado que calcula el porcentaje de tamaño de partículas (%DTP) retenidas en cada una de las mallas utilizadas.

El tamizado se realizó tomando muestras de 20 g agitando durante 15 min para realizar la separación de partículas.

De cada malla se determinó el peso retenido de hongo molido y con ello se calculó el porcentaje en relación al total de muestra expresándose como %DTP de cada una de las fracciones del hongo.

Se utilizaron las siguientes fórmulas:

No. de malla x gramos de muestra final = Resultado

Suma de resultados / Muestra inicial (20 g) = No. Malla

6.4.3.2 Color.

Se realizó la caracterización del color del hongo seco y molido y de las extracciones hidroalcohólicas por el método de colorímetro y por espectrofotometría.

Se utilizó un colorímetro de Reflectancia Hunter Lab para obtener la Luminosidad (L) y las coordenadas de color a y b. Se utilizó un patrón de calibración blanco con las coordenadas L= 92.19, a = -1.31, b = 0.95. 10° del observador e iluminante D65.

Se realizó un barrido en espectrofotómetro de las extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento desde una longitud de onda de 250 hasta 500 nm.

6.4.3.3 pH

Fue tomado 1 g del hongo molido y se licuó en 50 ml de agua destilada. Se calibró el potenciómetro con soluciones reguladoras de pH 4 y pH 7 y se procedió a realizar la lectura (NMX-F-317-S-1978).

6.4.4 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal del hongo *Ganoderma* consistió en la determinación de humedad, extracto etéreo (Soxhlet), cenizas, carbohidratos totales, proteínas (Kjeldhal) y Fibra total (AOAC, 2005).

6.4.5 Determinación de Metales pesados

Los metales pesados en el hongo *Ganoderma* se determinaron mediante el método de Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) a la flama, según la Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Método de Prueba para la Determinación de Cadmio, Arsénico, Plomo, Estaño, Cobre, Fierro, Zinc y Mercurio en Alimentos, Agua Potable y Agua Purificada por Espectrometría de Absorción Atómica. Para esta determinación fue necesario realizar una digestión ácida utilizando HNO₃ y HClO₄.

6.5 Selección del Proceso de extracción del hongo *Ganoderma curtisii*

Para seleccionar el método de extracción a seguir en la presente investigación se realizaron 3 métodos de extracción que se describen a continuación:

6.5.1 Extracción hidroalcohólica hasta agotamiento

En una sola muestra de 5 g de hongo, se realizaron siete extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento comprendido este como una pérdida de color visual en el extracto, cada extracción se realizó con nuevo solvente (agua y etanol 3:2).

6.5.1.a Caracterización química de los extractos hidroalcohólicos hasta agotamiento de *G. curtisii*

Para evaluar la cantidad de compuestos presentes en cada extracción se realizaron cromatografías en capa fina de alta eficiencia (HPTLC). En la figura 15 se muestra el proceso de extracción hidroalcohólica hasta agotamiento del *Ganoderma curtisii*.

DIAGRAMA DE FLUJO EXTRACCIÓN HIDROALCOHÓLICA HASTA AGOTAMIENTO

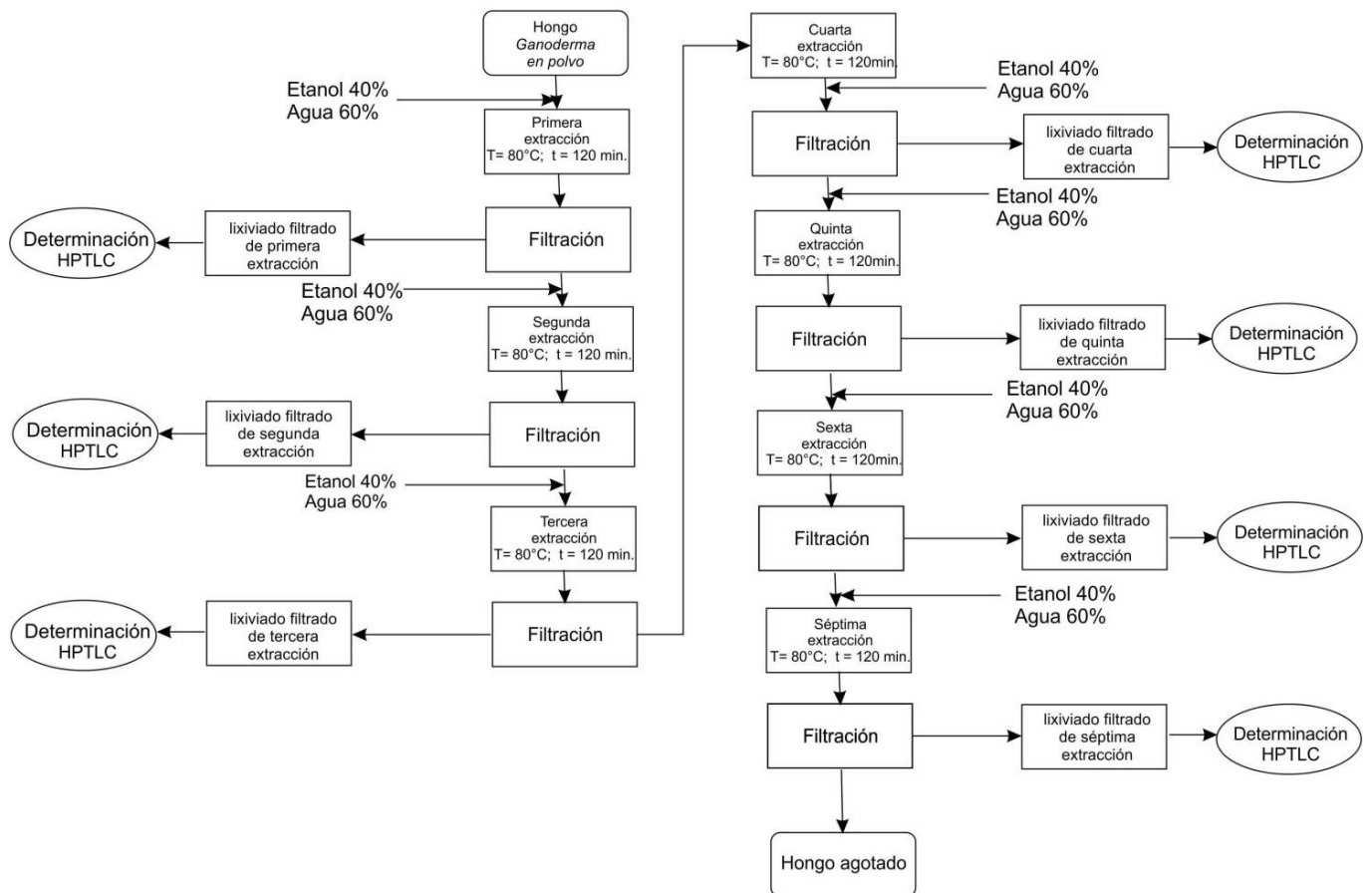


Figura 15. Diagrama de flujo de la Extracción Hidroalcohólica hasta agotamiento

6.5.2 Extracción por calentamiento directo

Se realizó una extracción por calentamiento directo del hongo (5 g) con los solventes (alcohol y agua) por separado a la temperatura de ebullición de cada uno de los solventes. Se hicieron dos extracciones con cada tipo de solvente. En la figura 16 se muestra el equipo utilizado para esta extracción.

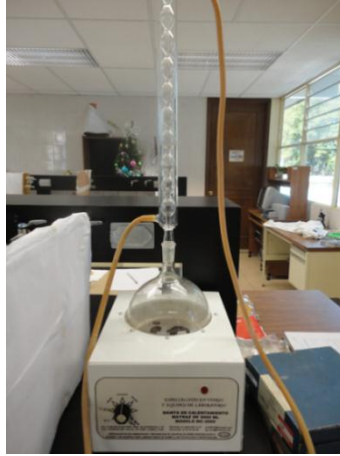


Figura 16. Extracción por calentamiento directo

6.5.3 Extracción por el Método de Soxhlet

Se realizó la extracción de 5 g de hongo *Ganoderma*, utilizando un equipo Soxhlet con los solventes (alcohol y agua) por separado a la temperatura de ebullición de cada uno de los solventes. Se hicieron dos extracciones con cada tipo de solvente. En la figura 17 se muestra el equipo utilizado para esta extracción.



Figura 17. Extracción por Soxhlet

La metodología a seleccionar estará en función de la técnica que permita el mayor arrastre de compuestos polisacáridos y triterpenos.

6.5.4 Diagrama de flujo del proceso de extracción de *Ganoderma*

En la figura 18 se muestra el diagrama del proceso de extracción de *Ganoderma* tanto para el método por calentamiento directo como por Soxhlet. Los dos métodos se realizan con los solventes Alcohol y Agua, a la temperatura de ebullición de cada solvente y durante el mismo tiempo de proceso de 120 minutos.

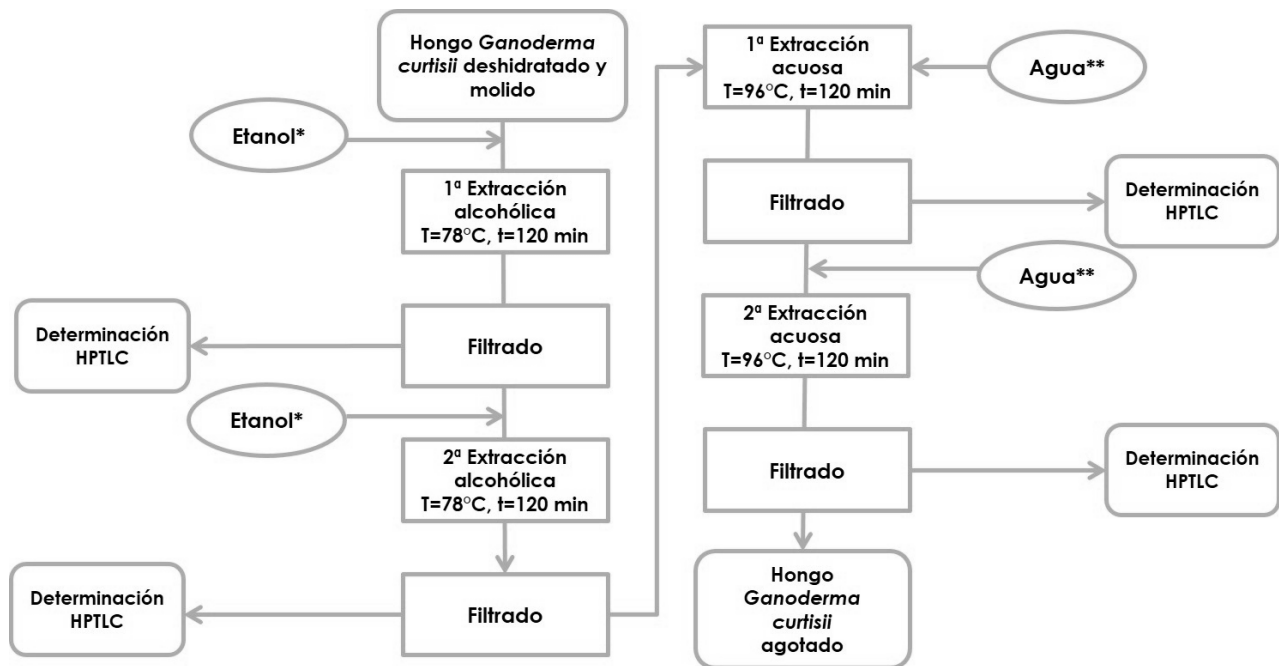


Figura 18. Diagrama de flujo del proceso de extracción de *Ganoderma*

*Por cada 5 gr. de hongo se utilizan 200 ml. de etanol

** Por cada 5 gr. de hongo se utilizan 200 ml. de agua.

Una vez seleccionado el método de extracción por calentamiento directo, se procedió a la extracción en función del diseño estadístico. Para los tratamientos, se consideraron los niveles de los factores establecidos en el diseño estadístico.

6.6 Caracterización de los extractos alcohólicos y acuosos.

La caracterización química del extracto de *Ganoderma curtisii* consistió en la determinación de Polisacáridos y Triterpenos, mediante las técnicas de cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC), Extracción y cuantificación de polisacáridos crudos por el método Fenol-sulfúrico (Skalicka-Wozniak, 2012) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (GC/EIMS) (Jin-Zhe et al., 2012; Wei et al., 2010; Ying Qi et al., 2012).

6.6.1 Cromatografías de capa fina de alta eficiencia HPTLC.

Las cromatografías de capa fina de alta eficiencia se realizaron en las extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento, en las extracciones alcohólicas y acuosas por el método de soxhlet y por calentamiento directo, así como en las extracciones alcohólicas por el método de calentamiento directo utilizando el modelo estadístico seleccionado para la metodología de superficie de respuesta a diferentes temperaturas y tiempos.

En las cromatografías realizadas a las extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento, se utilizaron como fase móvil, dos sistemas de solventes indicados para la identificación de terpenos, el primero fue diclorometano-metanol (9:1) y el segundo cloroformo-metanol-agua (30:4:1) y como revelador la vainillina-ácido sulfúrico.

En las extracciones alcohólicas por soxhlet y calentamiento directo se utilizó como fase móvil en el desarrollo de la cromatografía el sistema Cloroformo-metanol-agua (30:4:1) porque el tiempo de desarrollo fue menor y se observa mejor separación con este sistema de solventes. También se utiliza el revelador vainillina-ácido sulfúrico y el ergosterol (0.5 mg/ml) como patrón de referencia.

En las extracciones acuosas por soxhlet y calentamiento directo se utilizó como fase móvil en el desarrollo de la cromatografía el sistema Acetato de etilo-propanol-ácido acético-agua (16:8:8:4) y se utiliza el revelador de orcinol-ácido sulfúrico. Como patrones de referencia se utilizan estándares de azúcares: D-Glucosa (11 mg/1.5 ml), D-Galactosa (9.7 mg/1.5 ml), D-Manosa (9.9 mg/ml) y D-Xilosa (9.3 mg/ml).

Las cromatografías de capa fina de alta eficiencia se realizaron en las extracciones alcohólicas por el método de calentamiento directo, utilizando el modelo estadístico seleccionado para la metodología de superficie de respuesta a diferentes temperaturas y tiempos (Tabla 1 y 2).

Se utilizó como fase móvil en el desarrollo de la cromatografía el sistema diclorometano-metanol (9:1). Se utilizó vainillina-ácido sulfúrico como revelador y el ergosterol (0.5 mg/ml) como patrón de referencia (Wagner, 1996; Wagner, 2011).

Se utilizaron placas de HPTLC Fertigplatten Nano-ADAMANT UV 254 de 10 x 10 cm.

El equipo de HPTLC utilizado se muestra en la figura 19.



Figura 19. Equipo HPTLC automatizado

6.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de las extracciones alcohólicas.

Las muestras de las extracciones alcohólicas (100 μ l) se derivatizaron secándolas con N_2 , se mezclaron con 80 μ l de BSTFA (bis-trimetilsilyl-trifluoroacetamida) y 20 μ l de piridina, se incubaron en agitación durante 30 min a 80°C y después se les agregó 100 μ l de isoocetano.

Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases (Figura 20). Se inyectó 1 μ l de la muestra sin partición (splitless) y se utilizó helio como gas acarreador con un flujo constante de 1ml/min.

La colecta de información proveniente del equipo de espectrometría de masas se realiza por el programa MS Chem resultando en un gráfico de tiempo vs el total de iones registrados por el

electromultiplicador (Total Ion Chromatogram). Para cada componente eluyente de la columna o pico se consideró su tiempo de retención en el ápice de acumulación. En este punto se evaluó la composición de los iones. Se utilizó el programa Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) y para la identificación de los espectros que se compararon con el programa MS Data Search frente a los espectros de la base de datos del NIST 11 Mass Spectral Data Base del Departamento de Comercio de los Estados Unidos.



Figura 20. Equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas por impacto electrónico

6.6.3 Evaluación del contenido de polisacáridos en el extracto acuoso por calentamiento directo y por Soxhlet y en el extracto acuoso por calentamiento directo optimizado por MSR

Los polisacáridos fueron aislados de la extracción acuosa según el método propuesto por Skalicka (Skalicka-Wozniak 2012); mediante el cual se realizaron tres extracciones acuosas con 200 ml de agua en una misma muestra de 5 g de hongo *G. curtisii* deshidratado y molido con solvente nuevo (200 ml) en cada ocasión. Para las extracciones acuosas por calentamiento directo y Soxhlet se utilizó una temperatura de extracción de 85°C durante 5 horas. Para los trece tratamientos establecidos en el método estadístico se emplearon las temperaturas y los tiempos calculados para este método (

Tabla 2). Los tres extractos acuosos de cada tratamiento se combinaron y se concentraron a 100 ml (Figura 21). Posteriormente se agregaron 300 ml de etanol a 4°C y se mantuvieron a 4°C durante 24 horas, al término se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos para la obtención del precipitado, el cual se lavó con etanol 96% y se secó a 60°C. El residuo obtenido representa a los polisacáridos crudos o totales (Figura 22).



Figura 21. Combinación y concentración de las tres extracciones acuosas

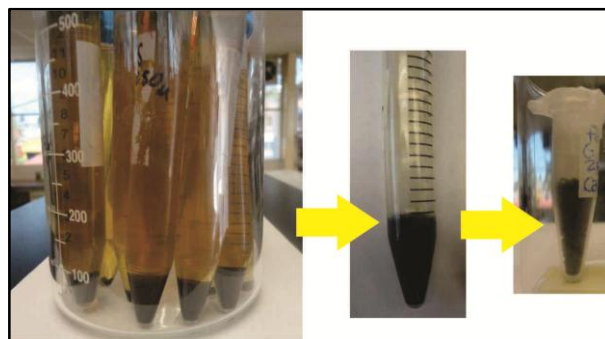


Figura 22. Polisacáridos precipitados y secos

6.6.3.a Determinación de azúcares totales en Polisacáridos crudos.

Los azúcares totales en la muestra de Polisacáridos crudos se determinaron utilizando el método fenol-sulfúrico (Dubois, 1956). Un miligramo de la muestra de polisacáridos crudos se disolvió en 10 ml de agua destilada. Un mililitro de esta solución se mezcló con 1 ml de solución de fenol al 5% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó en vortex, se dejó reposar 10 minutos y

después se colocó en un baño de agua a 25°C durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente (20°C). Se mezcló la solución en vortex y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Los azúcares totales se calcularon en base a una curva estándar de glucosa. El experimento fue realizado por triplicado.

6.6.3.b Procedimiento de Calibración.

La curva de calibración fue analizada tres veces con cinco diferentes concentraciones: 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml y 50 µg/ml de glucosa. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la absorbancia. Las curvas de calibración se caracterizaron por su coeficiente de regresión, la pendiente de la recta (b) y la intersección de la línea recta con el eje Y(a).

6.7 Determinación de la Actividad antioxidante de los Extractos de *Ganoderma curtisii* por el método DPPH

El ensayo de captación de radicales DPPH es un modelo ampliamente aceptado para evaluar la actividad eliminadora de radicales libres en un tiempo relativamente corto (Naik et al. 2003; Yuan et al. 2005). El ensayo evita reacciones secundarias tales como la quelación de iones metálicos y la inhibición enzimática, que complican los ensayos basados en radicales libres producidos en el laboratorio tales como el hidroxilo y el anión superóxido (Amarowicz et al., 2004). La capacidad de los antioxidantes para secuestrar DPPH se atribuye a su capacidad de donar hidrógeno (Liu et al. 2013).

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos de *Ganoderma curtisii* fue determinada utilizando como referencia la disolución de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acuerdo al método reportado por Chung-wah Ma et al. (2013). Se tomaron 2 ml de cada extracto (Etanólico, Hidroalcohólico y polisacáridos) con diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/ml) y se le adicionó a cada uno 2 ml de solución etanólica 0.2mM de DPPH. El control fue etanol como sustituto de DPPH y el etanol fue utilizado como blanco. Se agitaron los tubos en vortex durante 15 s, se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz, posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro. El ácido ascórbico fue utilizado como estándar positivo a las mismas concentraciones que las muestras. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A} \right) * 100$$

Donde A_s = absorbancia de la solución muestra y DPPH, A_c es la absorbancia de la solución control de etanol y A es la absorbancia de la solución incluyendo 2 ml de DPPH y 2 ml de etanol.

El parámetro IC_{50} que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, se calcula por interpolación en la gráfica de porcentajes de inhibición y los valores IC_{50} menores a concentraciones de 0.1 mg/ml no pueden ser calculados de la gráfica y se expresan como $IC_{50} < 0.1$ mg/ml (Figura 23). Un valor bajo de IC_{50} corresponde a una mayor actividad antioxidante del extracto del hongo.

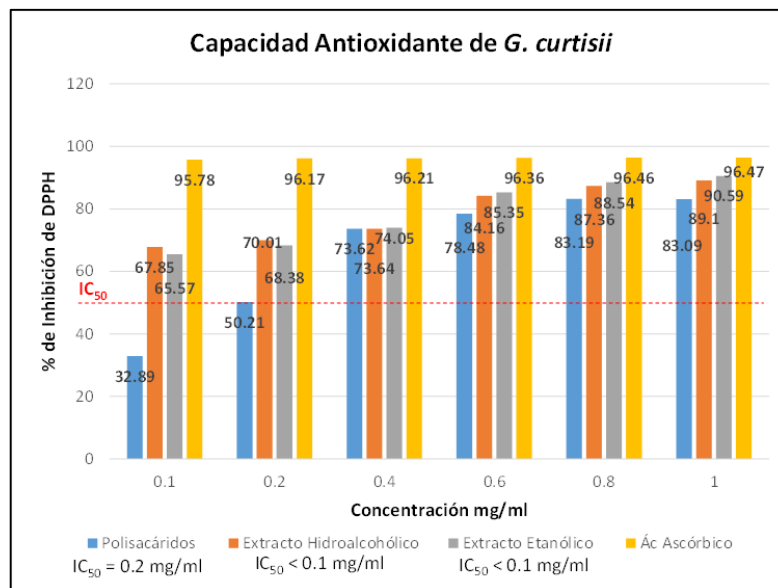


Figura 23. Gráfico de Capacidad Antioxidante de extractos de *G. curtisii*

6.8 Determinación de polifenoles totales en los extractos hidroalcohólico y etanólico

Para la determinación de polifenoles totales en los extractos de *Ganoderma curtisii* preparados, se siguió el método espectrofotométrico realizado por Nagaraj et al (2014) modificado. Extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de 5 g de *G. curtisii* se obtuvieron en una mezcla de 200 ml de agua/etanol (3:2) y en etanol (200 ml) a una concentración de 524.5 mg/100 ml y 344.1 mg/100 ml, respectivamente. Las muestras de extractos (0.5 ml) se mezclaron con reactivo de Folin-

Ciocalteu (2.5 ml, previamente diluido en agua 1:10, v/v) y carbonato de sodio (75 g/l, 2 ml). Los tubos se mezclaron en vortex por 15 s y se dejaron reposar en obscuridad por 40 min a temperatura ambiente (21°C). Se realizó una curva de calibración estándar de ácido gálico en agua (0.0094-0.15 mg/ml) (Figuras 24 y 25). Se midió la absorbancia a 765 nm. Para cada una de las muestras se calculó la concentración de ácido gálico usando la ecuación basada en la curva de calibración: $Y = 0.0974x - 0.0047$, $R^2 = 0.9995$; donde x fue la absorbancia y Y fueron los mg de ácido gálico. Con la concentración de ácido gálico obtenida, se calculó el contenido de compuestos fenólicos totales como ácido gálico equivalente (GAE) por la siguiente ecuación: $T = (C \times V) / M$. Donde T es el contenido fenólico total en mg/g de los extractos como GAE, C es la concentración de ácido gálico establecida a partir de la curva de calibración en mg/ml, V es el volumen de la solución del extracto en ml y M es el peso del extracto en gramos (Figuras 24 y 25).

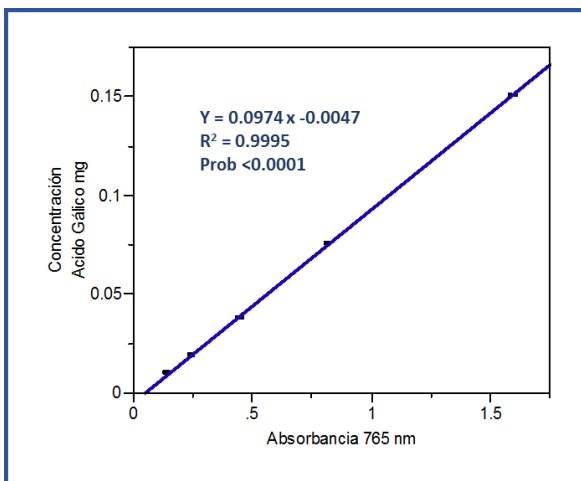


Figura 24. Curva de calibración de ácido gálico



Figura 25. Tubos con diferentes concentraciones de ácido gálico

7. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN ALCOHÓLICO-ACUOSA DE *Ganoderma curtisii*

Una vez seleccionado el método de extracción por calentamiento directo, se procedió a la extracción en función del diseño estadístico. Se estableció la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)(Huang et al., 2010) para identificar el punto óptimo al cual los factores temperatura y tiempo de extracción proporcionan el mayor rendimiento en la variable de respuesta: Cantidad de polisacáridos y triterpenos. El diseño experimental utilizado fue un diseño central compuesto (DCC).

Se elaboró un modelo codificado de segundo orden, de acuerdo a:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2$$

Dónde:

Y: es la respuesta estimada (Rendimiento); $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$: son los coeficientes de regresión; X_1 y X_2 son las variables independientes: temperatura y tiempo de extracción.

Se estableció un DCC para la extracción alcohólica y uno para la extracción acuosa.

7.1 Extracción alcohólica

El modelo incluyó 4 puntos factoriales, 5 réplicas en el punto central y 4 puntos axiales. Las variables dependientes fueron la temperatura de extracción (X_1) con tres niveles (54 °C, 64 °C, 74 °C) y tiempo de extracción (X_2) con tres niveles (90, 135 y 180 min). El arreglo experimental se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Arreglo experimental usado para las diferentes combinaciones de extracción etanólica: temperatura y tiempo de extracción.

No. Tto	Variables codificadas		Variables no codificadas	
	X1	X2	Temperatura de extracción (°C)	Tiempo de extracción (min)
1	-1	-1	54	90
2	-1	+1	54	180
3	+1	-1	74	90
4	+1	+1	74	180
5	$-\alpha (-1.414)$	0	50	135
6	$+\alpha (1.414)$	0	78	135
7	0	$-\alpha (-1.414)0$	64	71
8	0	$+\alpha (1.414)0$	64	199
9	0	0	64	135
10	0	0	64	135
11	0	0	64	135

12	0	0	64	135
13	0	0	64	135

7.1.1. Diagrama de flujo del proceso de extracción etanólica de *Ganoderma curtisii*

En la figura 26 se muestra el diagrama del proceso de extracción etanólica de *Ganoderma curtisii* por el método de calentamiento directo en función de las temperaturas y tiempos establecidos en el método estadístico de Metodología de superficie de Respuesta MSR (Tabla 1).

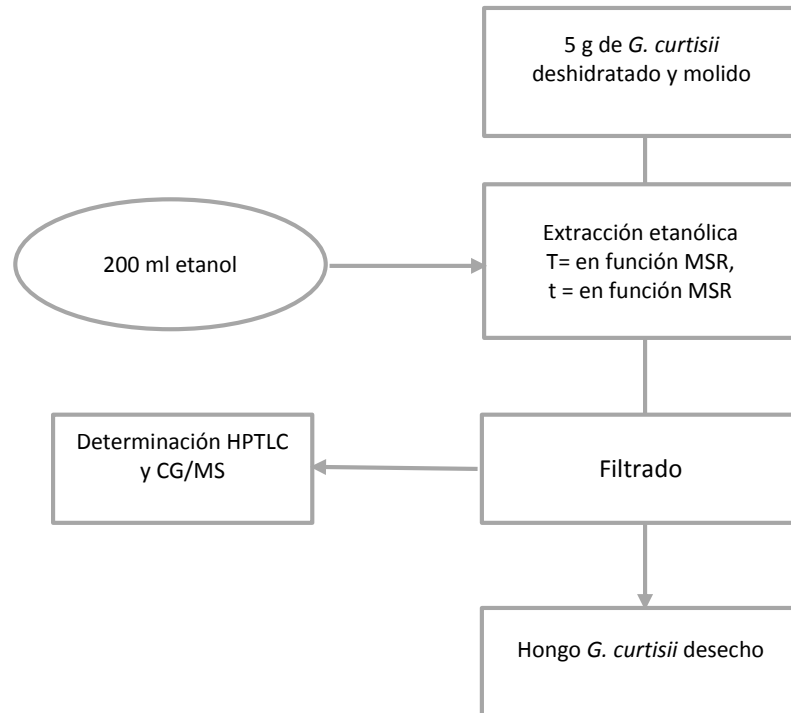


Figura 26. Diagrama del proceso de extracción etanólica por el método de calentamiento directo

7.2 Extracción acuosa

El modelo incluyó 4 puntos factoriales, 5 réplicas en el punto central y 4 puntos axiales. Las variables dependientes fueron temperatura de extracción (X1) con tres niveles (72 °C, 82 °C, 92 °C) y tiempo de extracción (X2) con tres niveles (90, 135 y 180 min). El arreglo experimental se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Arreglo experimental usado para las diferentes combinaciones de extracción acuosa: temperatura y tiempo de extracción

No. Tto	Variables codificadas		Variables no codificadas	
	X1	X2	Temperatura de extracción (°C)	Tiempo de extracción (min)
1	-1	-1	72	90
2	-1	+1	72	180
3	+1	-1	92	90
4	+1	+1	92	180
5	$-\alpha$ (-1.414)	0	68	135
6	$+\alpha$ (1.414)	0	96	135
7	0	$-\alpha$ (-1.414)	82	71
8	0	$+\alpha$ (1.414)	82	199
9	0	0	82	135
10	0	0	82	135
11	0	0	82	135
12	0	0	82	135
13	0	0	82	135

7.2.1. Diagrama de flujo del proceso de extracción acuosa de *Ganoderma curtisii*

En la figura 27 se muestra el diagrama del proceso de extracción acuosa de *Ganoderma curtisii* por el método de calentamiento directo en función de las temperaturas (T) y tiempos (t) del método estadístico de MSR (Tabla 2).

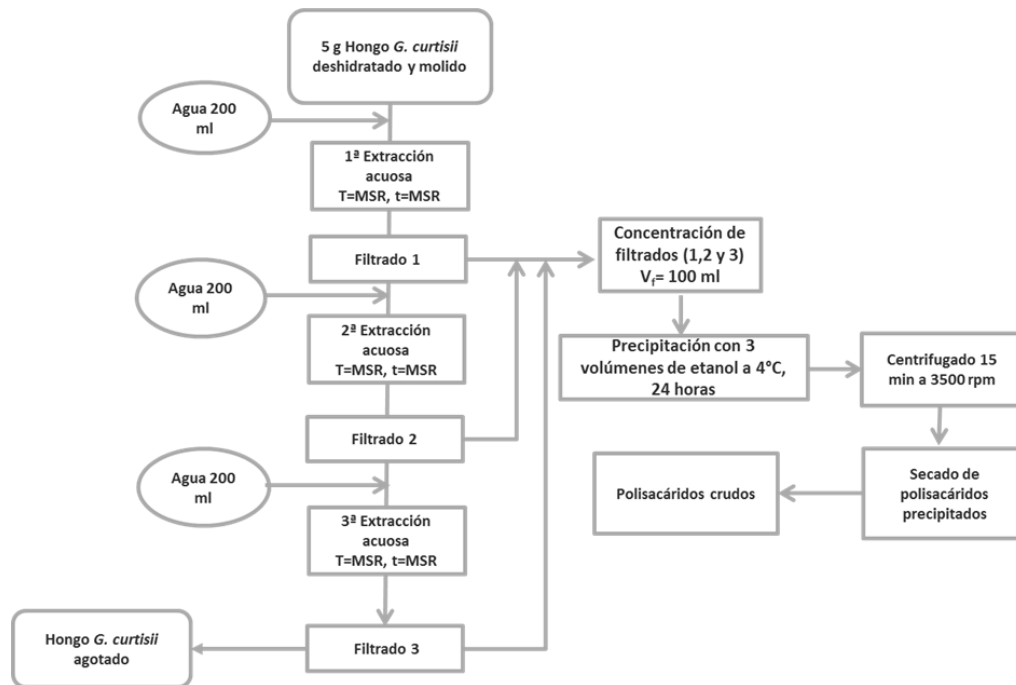


Figura 27. Diagrama del proceso de extracción acuosa de *Ganoderma curtisii* por el método de calentamiento directo

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (SD). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANDEVA) seguido de la prueba HSD de Tukey con $\alpha=0.05$. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron en $p < 0.0001$. Se utilizó el programa estadístico JMP versión 6.

8.1. Optimización

El valor numérico máximo o mínimo para cada variable de respuesta para encontrar el valor óptimo de mayor rendimiento por el proceso de extracción tanto alcohólica como acuosa se determinó usando el paquete estadístico JMP versión 6. Se usaron los modelos predictivos para representar gráficamente cada sistema a través de una superficie de respuesta.

Para validar el modelo se realizó un análisis de varianza, determinándose el coeficiente de determinación (R^2), y el F-cal, el cual, si es mayor que el F-tab., indica que el modelo interpreta adecuadamente la respuesta. Finalmente se construyeron superficies de respuesta para definir las regiones de interés.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Caracterización del Material de estudio "*Ganoderma curtisii*"

9.1.1 Caracterización Taxonómica

Se realizó la caracterización taxonómica del hongo *Ganoderma*, quedando registrada en el Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH con el número de ficha 24032. El hongo fue identificado como *Ganoderma curtisii*, especie que presenta una amplia plasticidad morfológica y que varía dependiendo del estado de maduración del basidiocarpo, no obstante, presenta dos características distintivas como son el contexto dúplex y las capas resinosas que no cambian con la edad del ejemplar (Torres-Torres y Guzmán-Dávalos, 2005), *G. curtisii* se distingue de *G. lucidum* por las esporas que son de menor tamaño y por la franja de color amarillenta que no está presente en *G. lucidum*.

En la Tabla 3 se enlistan las características macroscópicas y microscópicas del hongo estudiado, así como las características del hábitat donde se localizaron los ejemplares de estudio

Tabla 3. Ficha taxonómica de *Ganoderma curtisii* (Berk.) Murill

Reino:	Fungi	
Phyllum:	Basidiomycota	
Clase:	Agaricomycetes	
Orden:	Polyporales	
Familia:	Ganodermataceae	
Especie:	<i>Ganoderma curtisii</i> (Berk.) Murill, North Amer. Flora 9:120, 1908	
Características Macroscópicas	Forma	Reniforme a semicircular
	Tamaño	155-235 x 120-182 mm
	Textura	Consistencia corchoso a semileñoso
	Píleo	Opaco, no obstante, se observan secciones con brillo (laqueada), superficie glabra, margen entero a ondulado, en el margen blanco, amarillento claro a amarillo rojizo, al centro café rojizo, café violáceo (Figura 28).
	Estípite	60-150 x 35-45 mm, lateral a excéntrico, cilíndrico, atenuado hacia la base, rojo oscuro a café violáceo, superficie brillante.
	Contexto	Dúplex (dos capas) de 23 mm de grosor, la capa superior es blanquecina a café claro, en la cual se distingue una franja amarilla por debajo de la cutícula, la segunda capa es café con tres bandas resinosas (Figura 29).
	Poros	3-4 por mm, semicirculares a angulares, blanquecinos,

		amarillentos y café claro al tacto.
	Tubos	De 3 a 7 mm de longitud, café, sin estratificación.
Características microscópicas	Sistema hifal	Trimítico, con hifas generativas, esqueléticas y conectivas (Figura 30).
	Cutícula	De tipo himeniforme (Figura 32).
	Células claviformes	50-80 x 9-12.5 μm
	Basidiosporas	10-11.7 x 6.3-7 μm , elipsoides con el ápice truncado, doble pared (0.5 μm) de pared rugosa, con poro apical visible (Figura 31).
	Basidios	19-20 x 6-7 μm .
Características del hábitat	Sustrato/huésped	Gregario, sobre un tocón de encino (<i>Quercus sp.</i>) en bosque de pino-encino.
	Ubicación hábitat	México, Michoacán, Charo, La Escalera. Latitud norte: +19.36.09; Longitud oeste: -101.01.05, Altitud: 1721 msnm
Notas		Considerado por algunos como una forma de <i>G. lucidum</i> .
Referencias		Overholts (1953), Lowe & Gilbertson (1961), Gilbertson & Ryvardeen 1987, Torres-Torres, M. G. y L. Guzmán-Dávalos. (2005).
Determinación Taxonómica		D.C. Víctor Manuel Gómez Reyes Responsable de la colección de macromicetos del Herbario de la Facultad de Biología (EBUM). UMSNH
Ficha Herbario		EBUM 24032



Figura 28. Píleo de *Ganoderma curtisii*

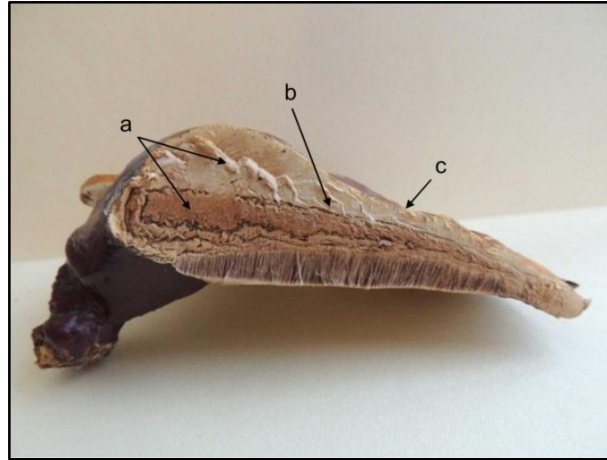


Figura 29. Caracteres distintivos de *G. curtisii*: a) Contexto dúplex; b) las capas resinosas; c) franja amarilla por debajo de la cutícula.

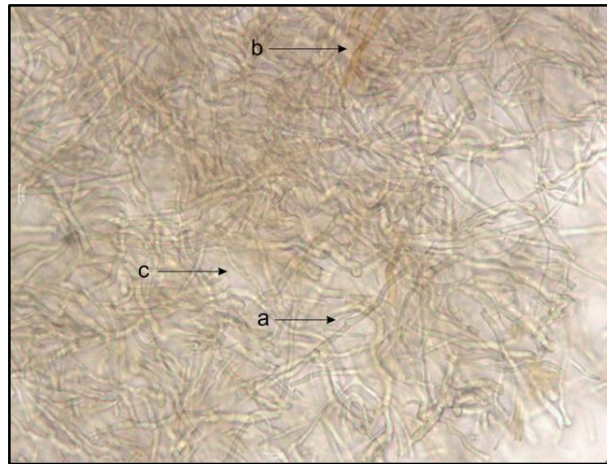


Figura 30. Sistema hifal trimitico. a) hifas generativas; b) Hifas esqueléticas; c) hifas conectivas.



Figura 31. Basidiosporas de doble pared y ornamentadas



Figura 32. Trama de la cutícula himeniforme, se distinguen por las células claviformes.

Ganoderma curtisii es considerado por algunos micólogos como una variedad diferente de *Ganoderma lucidum*, debido a sus colores amarillo brillante y a la restricción geográfica para el sudeste de Estados Unidos y México. Sin embargo, la mayoría considera a *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma curtisii* como la misma especie debido a su apariencia y hábitat similares, ambos prefieren crecer en maderas duras. En "North American polypores", Gilbertson y Ryvarden (1987), no consideran a *G. curtisii* una especie separada de *G. lucidum*.

La razón principal para mantenerlos como especies separadas es la especificidad de cada hongo a su hospedador.

En México la especie *Ganoderma curtisii* ha sido registrada casi en toda la república (Torres-Torres y Guzmán-Dávalos, 2005), creciendo desde los 1000 hasta los 2000 msnm.

9.1.2 Caracterización Físicoquímica

- **Tamaño de partícula por tamizado.**

Tabla 4. Resultados Tamaño de Partícula

N° de muestra	N° de malla	Muestra inicial (g)	Muestra final (g)	Resultados
M1	10	20	4.3347	43.347
M2	20	20	10.4502	209.004
M3	40	20	1.9070	76.28
M4	60	20	2.3747	142.482
				471.113/20
Promedio				23.555

El tamaño de partícula del hongo fue de 0.841 mm que corresponde a la malla #20

- **Color.**

Los resultados obtenidos en la determinación de color de la muestra de hongo *Ganoderma curtisii* se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de Color de *G. curtisii*

N° muestra	Muestra estándar L	a Verde - Rojo +	b Amarillo + Azul -	°Hue	Chroma
M1	32.80	8.43	14.91		
M2	32.78	8.50	14.91		
M3	32.77	8.43	14.89	60.438	17.133
Promedio	32.783±0.03	8.453±0.07	14.903±0.02		

Valores positivos (+), Valores negativos (-)

El valor L indica una baja luminosidad reflejada por el material de estudio. En referencia a la coordenada de color “a” su valor positivo indica una coloración rojiza en la muestra, en tanto que la coordenada de color “b” con valores positivos indica tonos amarillos.

Considerando “L” y las coordenadas de color “a” y “b”, el valor de °Hue (60.438) coloca a la muestra en los grados de coloración rojo-anaranjados (Figura 33).



Figura 33. Coloración hongo *Ganoderma*

El valor de Chroma de 17.133 indica que la coloración es intensa, alejándose de las tonalidades grises.

La coloración del hongo no varía con la edad del ejemplar.

- **pH**

El pH fue de 5.18. En estudios realizados en el cultivo de *Ganoderma* (Papinutti L., 2009), se ha demostrado que el pH influye de manera importante en la producción de exopolisacáridos como los

B-glucanos que tienen un importante efecto antitumoral. El rango de pH entre 5 y 6 fue el que permitió una mayor producción de este tipo de compuestos. El pH registrado en la determinación de la muestra de *G. curtisii* objeto del presente estudio se encuentra situado en estos valores de pH, por lo que puede suponerse que el hongo de cultivo silvestre se desarrolla también en este intervalo de pH.

- **Análisis químico proximal**

En la tabla 6 se enlistan los resultados obtenidos en porcentajes de los análisis realizados a la muestra de hongo *Ganoderma curtisii*. Se observa que los carbohidratos representan el mayor porcentaje de compuestos presentes en el hongo, seguido por la fibr, esto está relacionado con los compuestos como la quitina que es un polisacárido estructural del hongo responsable de su dureza.

Tabla 6. Análisis Químico Proximal

Determinación	Porcentaje
Humedad	9.00±0.01
Materia Seca	91.0±0.05
Carbohidratos	53.31±0.03
Fibra cruda	20.67±0.12
Proteína	15.18±0.25
Cenizas	10.48±0.05
Grasas	0.37±0.01

9.1.3 Determinación de Metales

El análisis de metales (Tabla 7) indica cantidades por debajo de la dosis letal (LD*) y de la Ingesta diaria aceptable (ADI**) de Plomo (Pb), Cromo (Cr), Cadmio (Cd), Níquel (Ni), Zinc (Zn) y Arsénico (As); cantidades de Cobre (Cu) y Hierro (Fe) similares a lo reportado en la literatura (Durkan, 2008; Chiu et al., 2000). La presencia de Calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K) concuerda con lo reportado por Watcher-Galor (2004).

Tabla 7. Contenido de Metales en hongo *Ganoderma curtisii*

Muestra	mg/Kg (base seca)										
	As	Cu	Pb	Cr	Zn	Ni	Cd	Fe	Ca	Mg	K
<i>G. curtisii</i>	<LD*	20.9	<LD*	<LD*	<LD*	<LD*	<LD*	1067.4	163.16	179.85	205.53
	<ADI**	±0.2	<ADI**	<ADI**	<ADI**	<ADI**	<ADI**	±0.3	±0.5	±0.05	±0.8

LD = Dosis Letal

ADI= Ingesta Diaria Aceptable

*Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995 ** Codex Alimentario 193-1995

9.2 Extracciones de *Ganoderma curtisii*.

9.2.1 Proceso de extracción hidroalcohólica de *Ganoderma curtisii* hasta agotamiento

En la figura 34 se muestra cada una de las extracciones y la coloración que presentaron las extracciones hidroalcohólicas de *G. curtisii*. Se observa que la intensidad del color disminuye conforme se incrementa el número de extracción siendo la extracción 7 la que presenta menor coloración, lo anterior está directamente relacionado con la cantidad de compuestos extraídos siendo el de mayor concentración la muestra 1, esto puede ser observado en las cromatografías de capa fina (9.2.1.d).

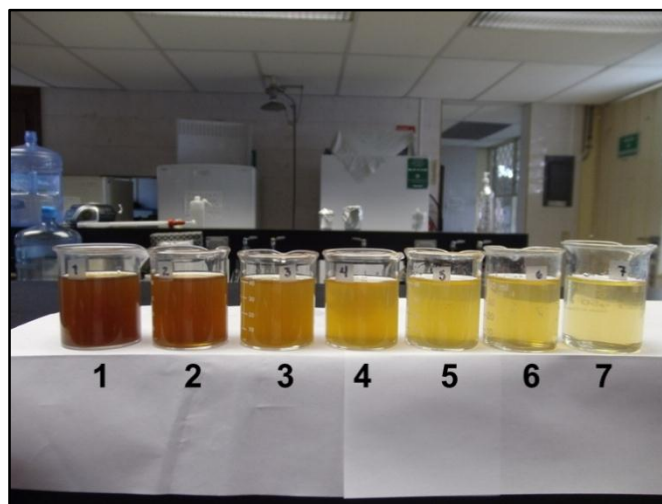


Figura 34. Extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento

9.2.1.a Determinación de color de Extracciones hidroalcohólicas de *G. curtisii* por colorimetría

Los resultados de la determinación de color de cada una de las extracciones hidroalcohólicas se muestran en la tabla 8. En las extracciones de la 1 a la 5 se observan valores de “a” positivos, indicando tonalidades rojas, mientras que los valores de las extracciones 6 y 7 son negativos ubicándose en el rango de coloración verde. En los valores de “b”, todas las extracciones presentaron resultados positivos clasificándose en las tonalidades amarillas. Los valores de °Hue están entre los tonos rojos hasta los amarillos. Y los valores de Chroma van disminuyendo indicando una pérdida de color.

Tabla 8. Resultados de Color para las siete extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento de *G. curtisii*

N° muestra	Muestra estándar L	a Verde - Rojo +	b Amarillo + Azul -	°Hue	Chroma
Extracción 1	8.406±0.23 c	1.75±0.31 ab	3.466±0.25 ab	63.210±2.42 d	3.89±0.25 a
Extracción 2	9.566±0.23 ab	2.42±0.31 a	3.816±0.25 b	57.618±2.42 d	4.21±0.25 a
Extracción 3	10.496±0.23 a	1.526±0.31 ab	3.596±0.25 ab	67.005±2.42 cd	3.913±0.25 a
Extracción 4	9.826±0.23 a	0.666±0.31 bc	3.033±0.25 abc	77.615±2.42 bc	3.107±0.25 ab
Extracción 5	8.526±0.23 bc	0.293±0.31 bc	2.573±0.25 bcd	83.503±2.42 ab	2.553±0.25 bc
Extracción 6	7.41±0.23 cd	-0.026±0.31 c	2.046±0.25 cd	97.242±2.42 a	2.052±0.25 bc
Extracción 7	6.81±0.23 d	-0.1±0.31 c	1.376±0.25 d	94.156±2.42 a	1.381±0.25 c

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia estadística en las medias, Tukey-Kramer HSD.

9.2.1.b Determinación de color de Extracciones hidroalcohólicas por espectrofotometría.

En la figura 35 es apreciable que la absorbancia de cada una de las extracciones va disminuyendo, siendo las extracciones 1 y 2 las que presentan absorbancias mayores y a partir de la extracción 3 las absorbancias disminuyen considerablemente, confirmándose la relación de color con la cantidad de absorbancia registrada y número de compuestos. Existe una correlación importante entre la coloración de los compuestos orgánicos y su estructura. Diversos compuestos orgánicos que presentan enlaces conjugados tienen influencia en la longitud de onda y las absorbancias que presentan. Los picos de absorbancias de los compuestos que presentan mayor cantidad de enlaces conjugados en su estructura se localizan en regiones de longitudes de onda superiores a los compuestos con menos enlaces conjugados. Los picos de absorción también se ven influenciados por los grupos funcionales presentes en la estructura química. Entre más grupos funcionales tiene un compuesto la absorbancia se presenta a longitudes de onda mayores (Shimadzu, 2009). Algunos de los compuestos identificados en los extractos del hongo del género *Ganoderma* son polifenoles, ácidos grasos insaturados y terpenoides, que tienen en sus estructuras enlaces conjugados y grupos funcionales hidroxilo que presentan absorbancias en longitudes de onda de regiones UV entre 220 y 320 nm (Chentan, 2007). Las absorbancias registradas en las extracciones hidroalcohólicas 1 y 2 están entre las regiones UV de 250 a 350 nm, por lo que se deduce que la presencia de estos

compuestos está relacionada con la coloración de éstas extracciones y que la disminución de color y absorbancias en las extracciones 3 a 7 se debe a una menor cantidad de compuestos en estas.

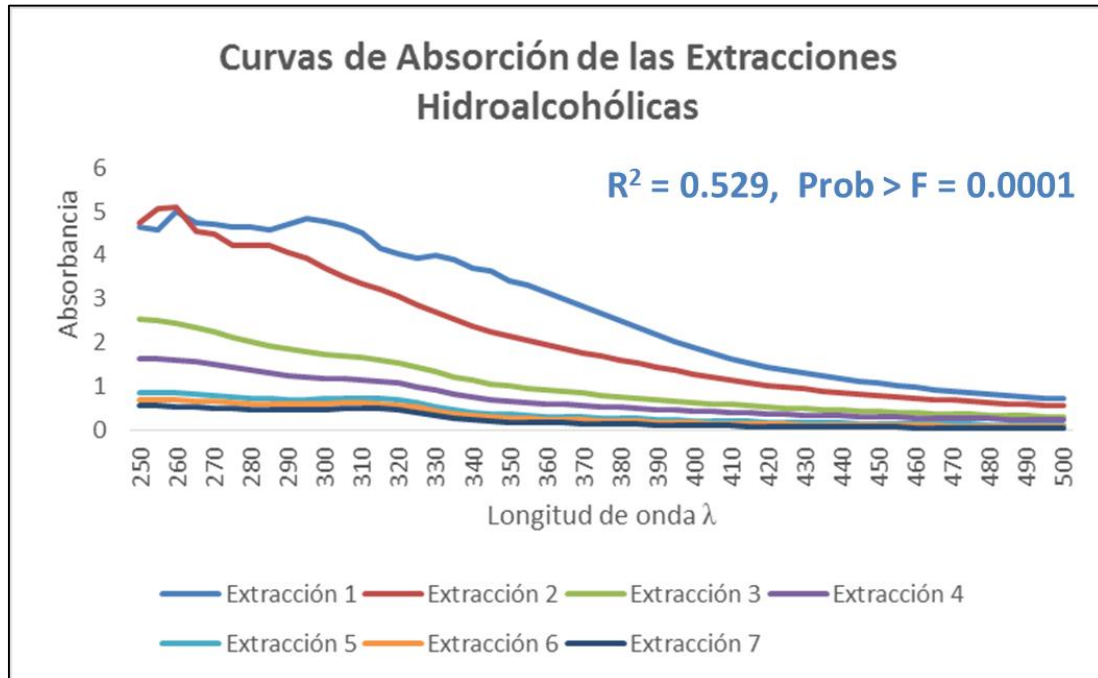


Figura 35. Curvas de absorción de extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento de *G. curtisii*.

9.2.1.c Determinación de pH de Extracciones Hidroalcohólicas de *G. curtisii*

En la figura 36 se muestran los diferentes valores de pH de las siete extracciones hidroalcohólicas. A partir de la primera extracción, el valor de pH se incrementa con respecto al pH del hongo deshidratado. Lo anterior, está relacionado con la cantidad y el tipo de compuestos extraídos. Entre los compuestos identificados en las extracciones de *Ganoderma*, los ácidos carboxílicos, los ácidos grasos y los compuestos fenólicos, influyen en el pH ligeramente ácido que presentan los extractos y el aumento en el valor del pH de las extracciones tiene relación con la disminución de estos compuestos en las extracciones 3 a 7. Chentan et al., (2007) mencionan que los compuestos fenólicos son más estables a pH entre 3 y 6, y que la concentración de estos disminuye al aumentar el pH del medio. Friedman estudió la estabilidad de los polifenoles de plantas y estableció que el pH básico afecta su estabilidad (Friedman M. and Jürgens H. S., 2000).

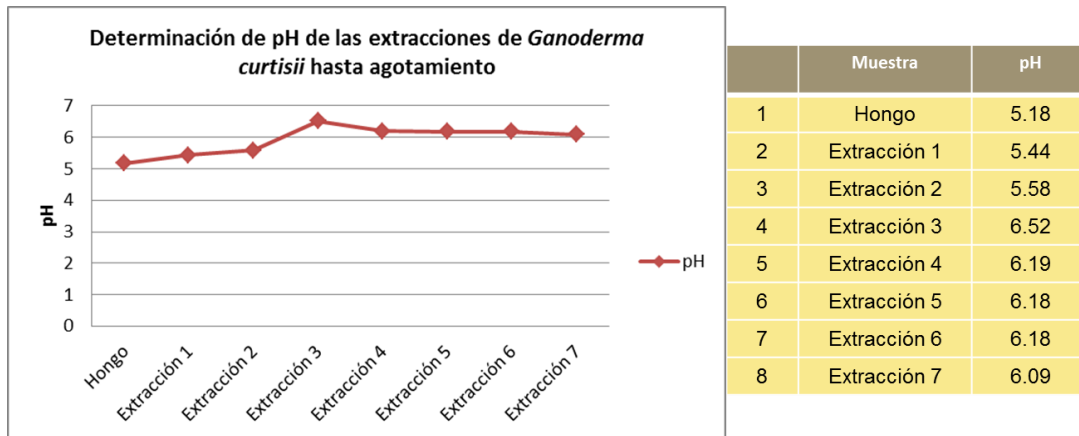


Figura 36. Valores de pH para las siete extracciones hidroalcohólicas hasta agotamiento.

9.2.1.d Determinación por HPTLC de compuestos terpénicos presentes en las Extracciones Hidroalcohólicas.

En las figuras 37 y 38 se presentan las placas de HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas reveladas y analizadas con luz blanca en las cuales se observa que la cantidad de compuestos terpénicos es mayor en las dos primeras extracciones, a partir de la tercera extracción ya no hay presencia considerable de compuestos.

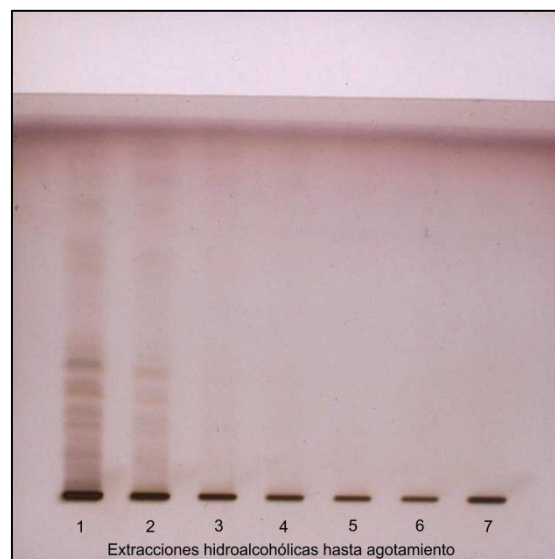


Figura 37. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de *Ganoderma curtisii* en solvente diclorometano-metanol

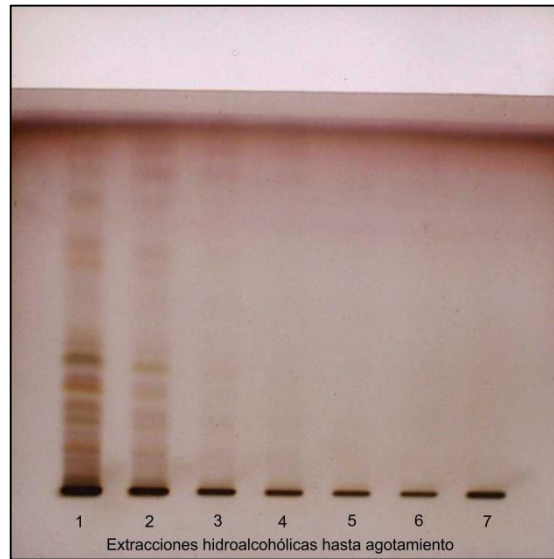


Figura 38. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de *Ganoderma curtisii* en solvente Cloroformo-metanol-agua.

En las figuras 39 y 40 se presentan las placas de HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas reveladas y analizadas a 254 nm y 366 nm respectivamente, en las cuales también se observa que la cantidad de compuestos terpénicos es mayor en las dos primeras extracciones, y que a partir de la tercera extracción disminuye considerablemente la presencia de compuestos.

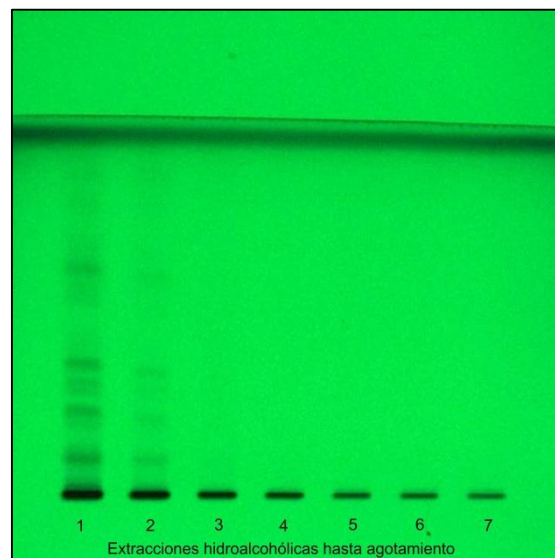


Figura 39. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de *Ganoderma Curtisii* a 254 nm

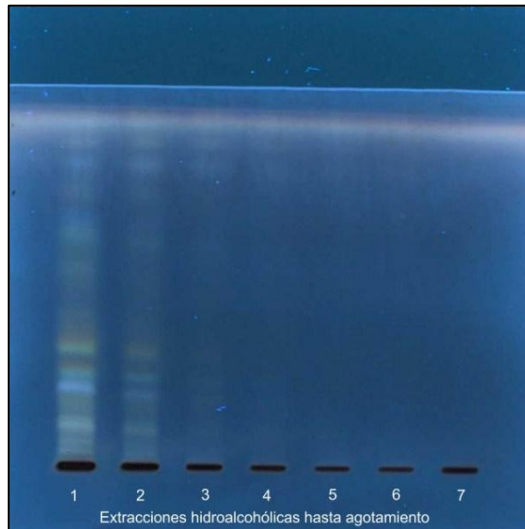


Figura 40. HPTLC de las 7 extracciones hidroalcohólicas de *Ganoderma Curtisii* a 366 nm.

Lo anterior lleva a considerar que en las dos primeras extracciones existió un mayor arrastre de compuestos terpénicos, por lo que no es recomendable una tercera extracción.

Estos resultados complementan las observaciones realizadas en las pruebas de colorimetría y espectrofotometría en donde también se observa una coloración más intensa en las dos primeras extracciones (9.2.1.a y 9.2.1.b).

9.2.2 Extracción por calentamiento directo

En la figura 41 se presentan las extracciones realizadas por calentamiento directo, se observa que el color de las segundas extracciones tanto de alcohol como de agua disminuye. Sin embargo el cambio de solvente de alcohol a agua, permite extraer compuestos solubles en este solvente y que no son extraídos por el etanol.



Figura 41. Extracciones de Alcohol y agua

Determinación de pH de Extracciones por calentamiento directo

Se determinó el pH de las extracciones realizadas por calentamiento directo. El pH de las extracciones alcohólicas y acuosas por calentamiento directo se muestra en la figura 42, en ella se observa un aumento de pH de 6.31 a 6.59 entre las extracciones alcohólicas y un descenso de pH de 6.19 a 5.69 entre las extracciones acuosas.

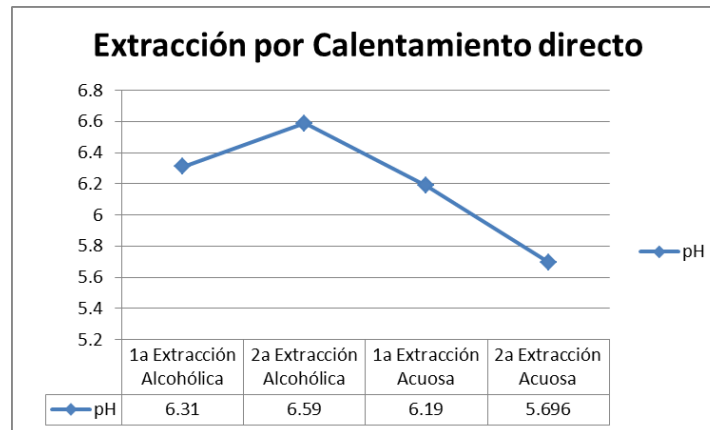


Figura 42. pH de extracciones por Calentamiento directo.

9.2.3 Extracción por Soxhlet

En la figura 43 se muestran las extracciones de *G. curtisii* por Soxhlet. La coloración de las extracciones es menos intensa en comparación a las extracciones por calentamiento directo. No obstante, siguen el mismo patrón de comportamiento que con el calentamiento directo (9.2.2).



Figura 43. Extracciones de Alcohol y agua por Soxhlet

Determinación de pH de Extracciones por Soxhlet

El pH de las extracciones alcohólicas y acuosas por Soxhlet se presenta en la figura 44. Se observa un aumento de pH de 6.11 a 6.34 entre las extracciones alcohólicas y un descenso de pH de 6.32 a 6.22 en las extracciones acuosas.

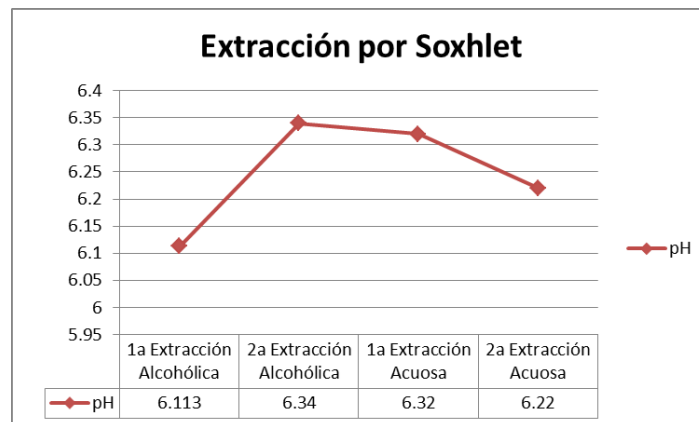


Figura 44. pH de Extracciones por Soxhlet

El aumento de pH observado en las extracciones etanólicas y el posterior descenso de pH en las extracciones acuosas es un indicativo de los diferentes compuestos extraídos por ambos solventes y la diferencia de valores de pH entre las primeras y segundas extracciones está relacionado con la cantidad y tipo de compuestos. En el caso de compuestos fenólicos, ácidos grasos, ácidos carboxílicos y otros compuestos extraídos con el etanol, los valores de pH aumentan entre las primeras y segundas extracciones, mientras que en el caso de los polisacáridos, los valores de pH disminuyen entre las primeras y segundas extracciones. La estabilidad de los polisacáridos es menor en valores de pH ácidos (Dumitri, 2005), contrario a los compuestos fenólicos que presentan mayor estabilidad a pH ligeramente ácidos (Chentan, 2007).

9.3 Identificación por HPTLC de compuestos terpénicos en extracciones alcohólicas por calentamiento directo y por Soxhlet.

En las figuras 45 y 46 se presentan las placas de HPTLC de las extracciones por calentamiento directo y por soxhlet analizadas con luz blanca. Se observa que la cantidad de compuestos terpénicos es mayor en las primeras extracciones, tanto por calentamiento directo como por soxhlet.

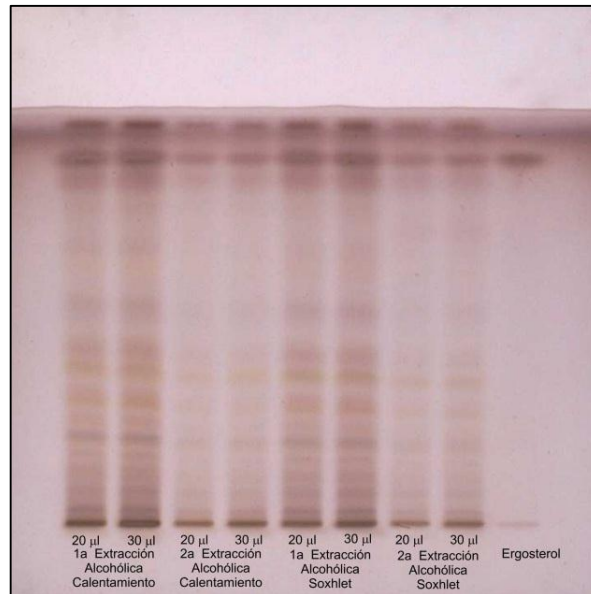


Figura 45. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento Directo y por Soxhlet.

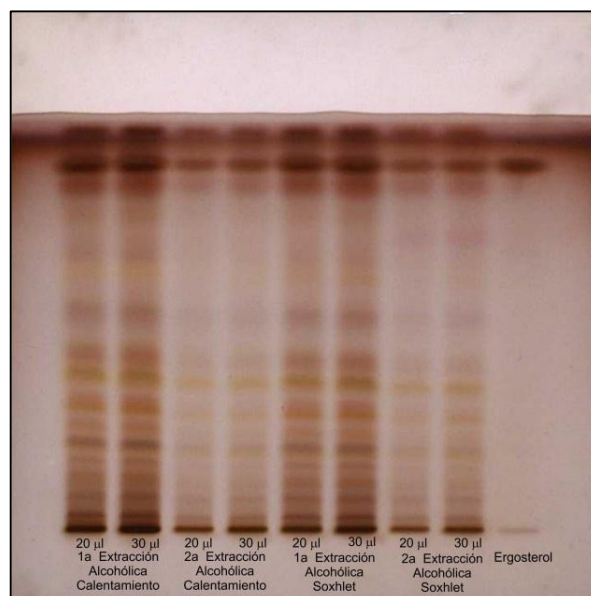


Figura 46. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento Directo y por Soxhlet.

En las figuras 47 y 48 se presentan las placas de HPTLC de las extracciones alcohólicas tanto por calentamiento directo como por soxhlet. En las cuales también se observa que la cantidad de compuestos terpénicos es mayor en las primeras extracciones que en las segundas.

No se observa una diferencia en la cantidad de compuestos que son extraídos por ambos métodos.

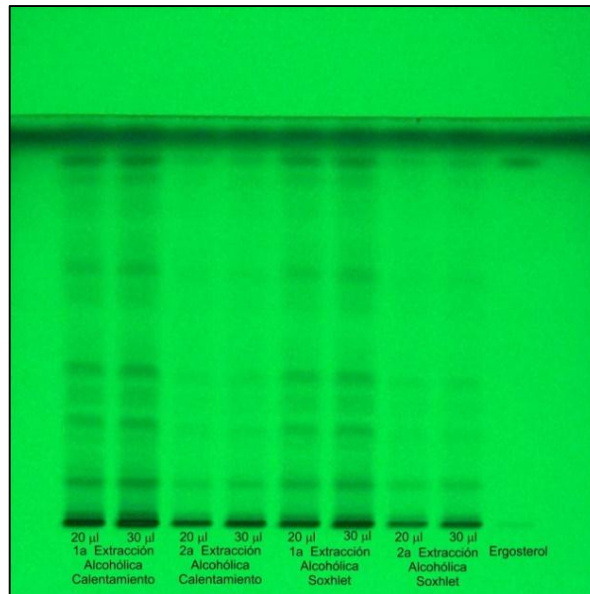


Figura 47. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento Directo y por Soxhlet a 254 nm.

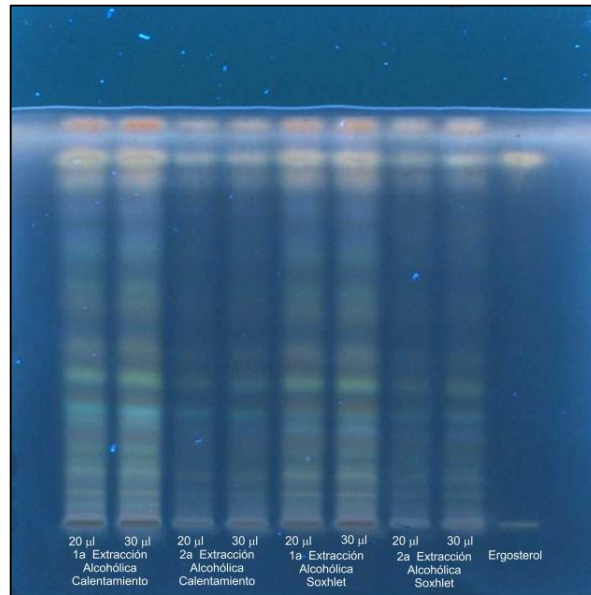


Figura 48. HPTLC de las extracciones alcohólicas por Calentamiento Directo y por Soxhlet a 366 nm.

9.4 Identificación por HPTLC de azúcares en extracciones acuosas por calentamiento directo y por Soxhlet.

Las placas de HPTLC de las extracciones acuosas por calentamiento directo y por soxhlet analizada con luz blanca y a 366 nm respectivamente, en las que se aplicaron 30 µl de muestra de la primera y segunda extracción así como 0.5 µl de cada uno los estándares de D-glucosa, D-galactosa, D-manosa y D-xilosa se muestran en las figuras 49 y 50. Se observa la presencia de glucosa, galactosa y xilosa en las primeras extracciones por calentamiento directo y por soxhlet, sin embargo en las segundas extracciones no se observa la presencia de estos azúcares. Estos monosacáridos son los principales azúcares que forman parte de los polisacáridos de *Ganoderma* (Sone, 1985; Wasser, 2005).

No se observa diferencia en la cantidad de compuestos que son extraídos por ambos métodos.

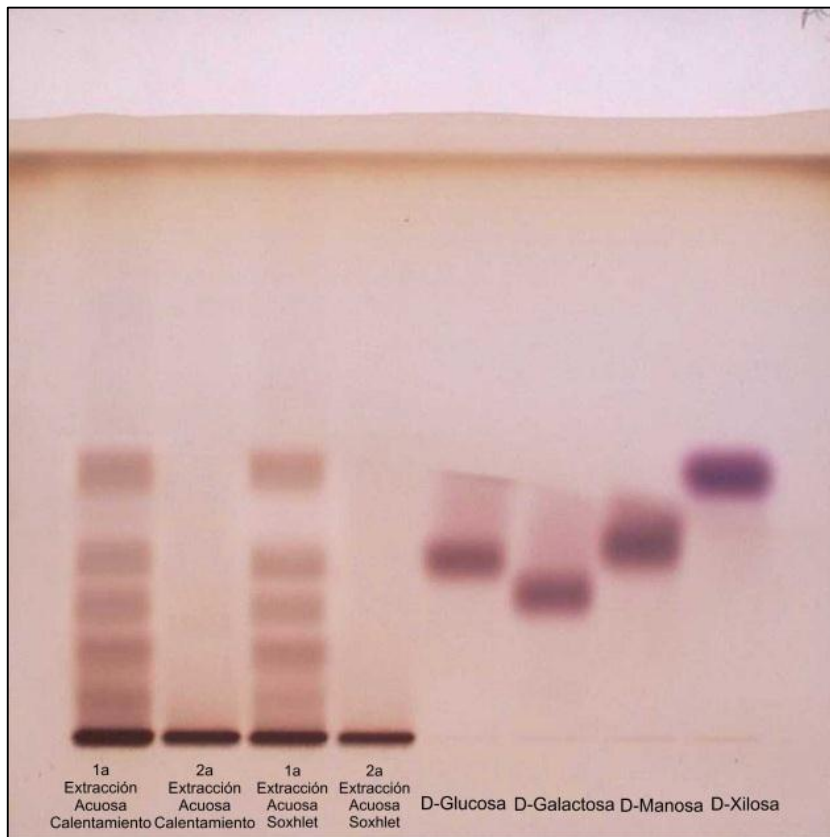


Figura 49. HPTLC de las extracciones acuosas por Calentamiento Directo y por Soxhlet y estándares de azúcares.

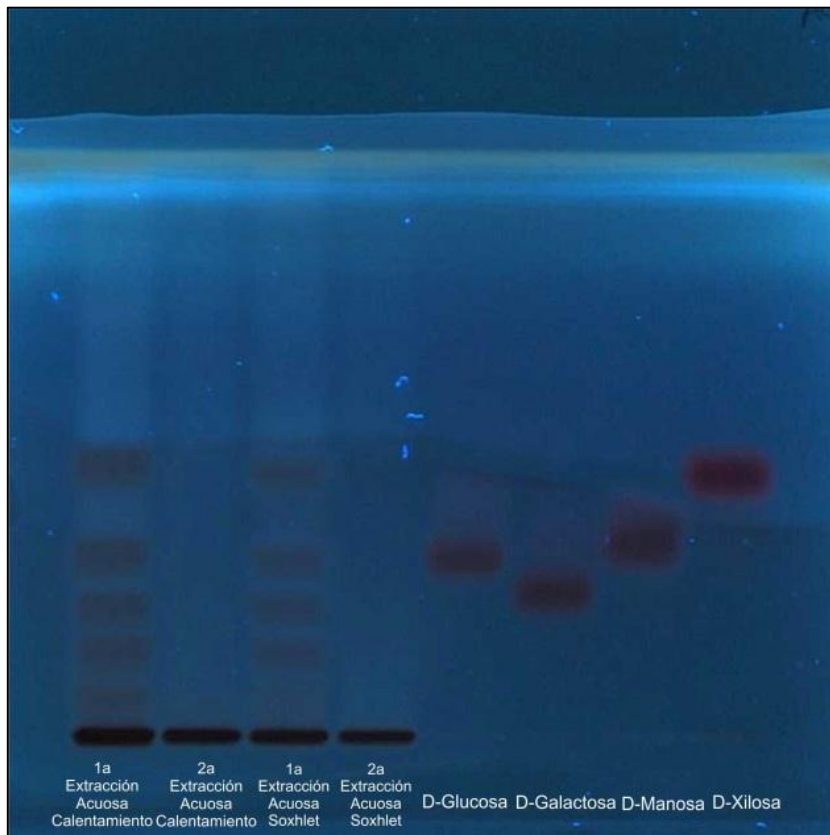


Figura 50. HPTLC de las extracciones acuosas por Calentamiento Directo y por Soxhlet y estándares de azúcares a 366 nm.

9.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de las extracciones alcohólicas.

La cromatografía de gases realizada a las extracciones alcohólicas del hongo *Ganoderma* por calentamiento directo y por Soxhlet muestra que en la extracción alcohólica por calentamiento directo hay 137 compuestos extraídos, tanto de interés particular como otro tipo de compuestos poco representativos. En la extracción por soxhlet hay 111 compuestos, lo que representa una diferencia de 26 compuestos entre los dos métodos de extracción. También se puede observar que las concentraciones de los compuestos son ligeramente mayores en la extracción por calentamiento directo. En la figura 51 se muestra un fragmento comparativo de la cromatografía de gases de las extracciones por calentamiento directo y por soxhlet.

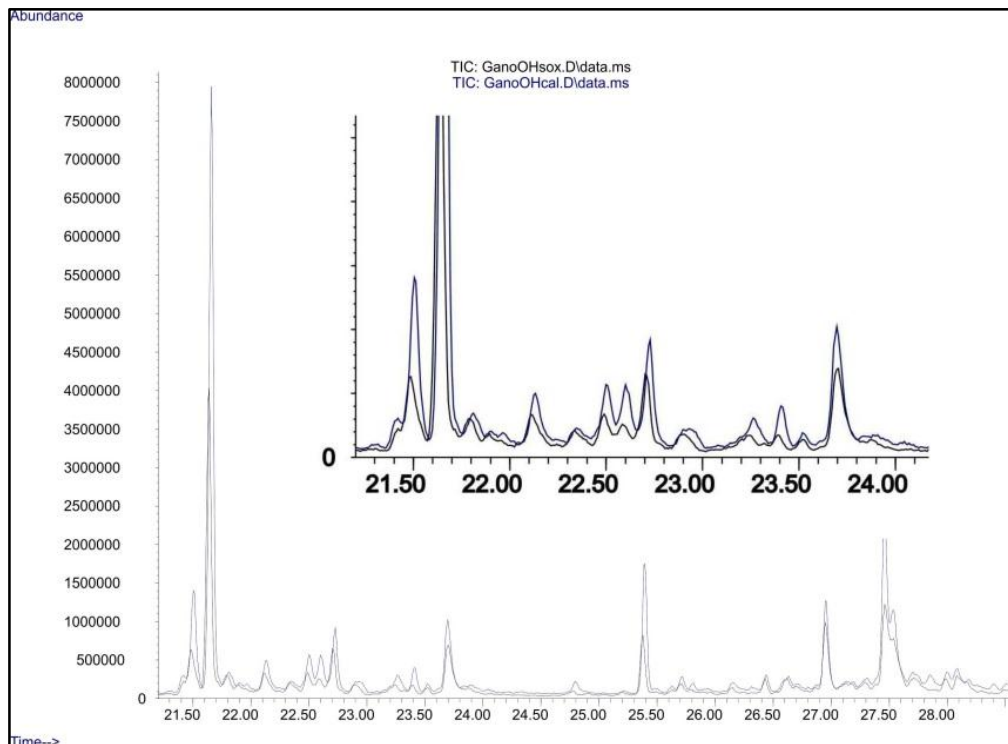


Figura 51. Comparativo de CG/MS de extracciones por calentamiento y por Soxhlet.

Entre los compuestos extraídos se identifican ácidos grasos: oleico, linoleico, palmítico y esteárico, derivados de ergostanol: Ergosta-5,7,22-trien-3- β -yloxy y 3- β ,22E-ergosta-7,22-dien-3-yloxy, azúcares como, α -D-glucopiranosida, β -D-glucopiranosida, Galactopiranosida, D-galactosa, D-manitol, D-Trehalosa y ácidos carboxílicos como ácido galactónico, ácido glucónico y ácido Glucurónico (Lv, 2012; Gao, 2012; Trigos, 2011; Chan, 2007; Wasser, 2005; Villares, 2012; Xie, 2012).

9.6 Extracción y Cuantificación de compuestos en extracciones acuosas por calentamiento directo y por Soxhlet.

En la figura 52 se presentan las tres extracciones tanto por calentamiento directo como las extracciones por soxhlet. Se observa que en las extracciones por calentamiento directo la coloración de las extracciones es más intensa que en las extracciones por soxhlet.



Figura 52. Comparativo extracciones acuosas por calentamiento directo y Soxhlet.

En la figura 53 se presentan las mezclas de las tres extracciones tanto por calentamiento directo como por soxhlet y sus correspondientes concentrados de 600 ml a 100 ml. Se observa en las mezclas de las extracciones una ligera diferencia de color en los dos extractos, siendo la extracción por calentamiento directo la que es más oscura. En los concentrados no hay diferencia visible de color.

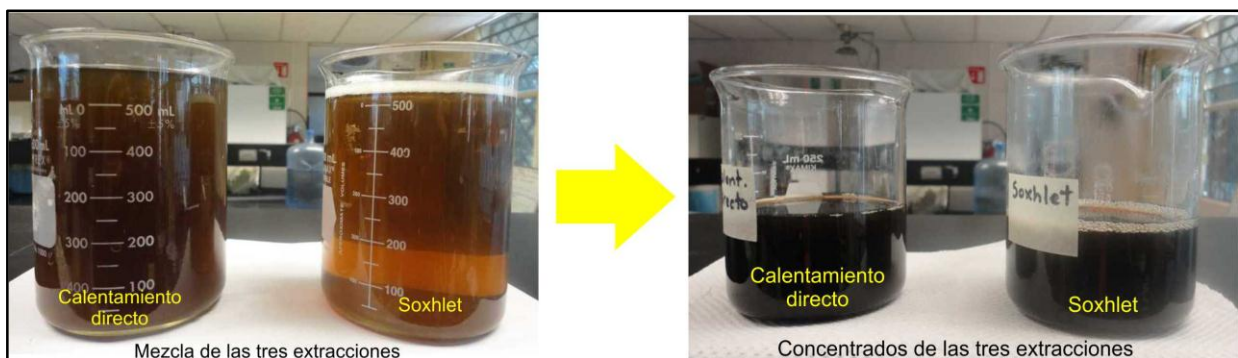


Figura 53. Concentrados extracciones acuosas por calentamiento directo y por Soxhlet.

En la figura 54 se presenta el precipitado formado después de agregar etanol frío, mantener 24 horas a 4°C y centrifugar los concentrados de las extracciones acuosas. Se presentan también los polisacáridos secos obtenidos de las extracciones acuosas por calentamiento directo y por Soxhlet. Se puede observar que el precipitado obtenido por calentamiento directo es mayor que por Soxhlet

y por consiguiente los polisacáridos obtenidos por el método de calentamiento directo: 192.1 mg. también son más abundantes que por el método de Soxhlet: 95.15 mg.

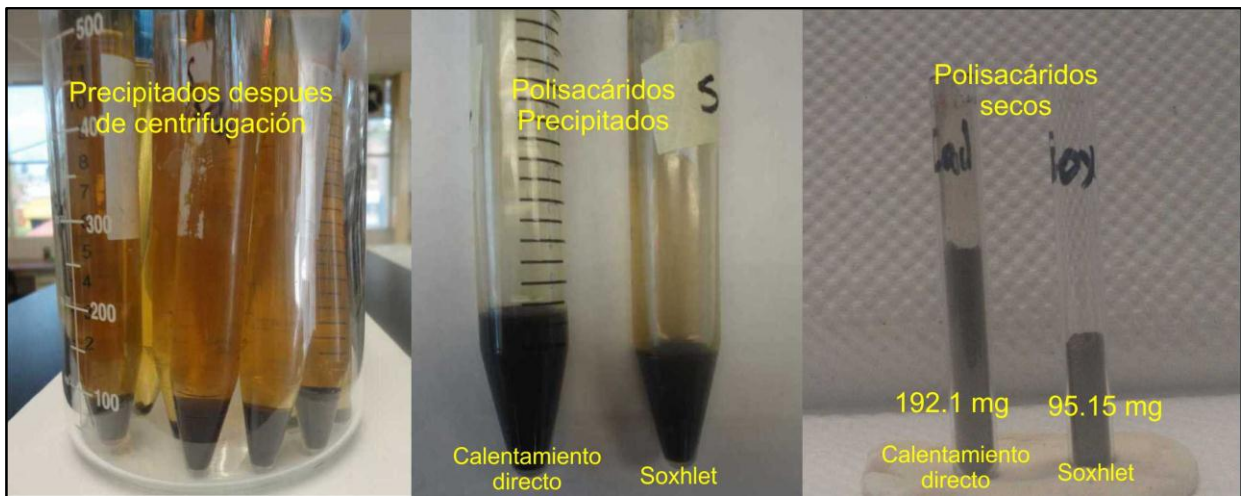


Figura 54. Polisacáridos crudos precipitados y secos.

9.6.1 Identificación y cuantificación de azúcares por el método Fenol-sulfúrico

En la figura 55 se muestran los tubos que contienen las soluciones coloreadas que se emplean para construir la curva estándar de calibración para la glucosa, siendo este el principal monosacárido que se forma al momento de hidrolizar los polisacáridos presentes en el *Ganoderma*.



Figura 55. Soluciones coloreadas para curva de calibración por el método fenol-sulfúrico

En la figura 56 se muestra la curva de calibración para la glucosa y la ecuación de regresión lineal resultante, en la que se interpoló la lectura promedio de la absorbancia registrada para las muestras de polisacáridos de *Ganoderma* (0.1 mg/ml), la cual fue de 0.75 ± 0.03 obteniéndose la

concentración de glucosa para las muestras de polisacáridos que fue de 64.99 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$ o bien 32.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

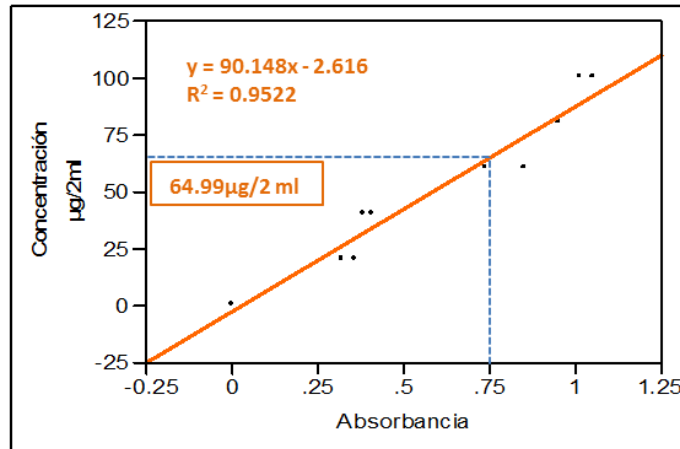


Figura 56. Curva de calibración para la glucosa y ecuación de regresión lineal

Por lo anterior, el método de extracción con mayor rendimiento para la obtención de compuestos bioactivos de *G. curtissi* es por calentamiento directo, utilizando los solventes agua y alcohol de forma independiente y realizando un máximo de dos extracciones por muestra de hongo.

9.7 Optimización de la extracción etanólica de *G. curtisii*.

El efecto de las variables de proceso, temperatura de extracción (54-74°C) y tiempo de extracción (90-180 minutos) fueron investigados en este trabajo. En total se realizaron 13 experimentos (Figura 57). Los valores de rendimiento experimentales y predichos medidos, así como la cantidad de compuestos presentes en los extractos etanólicos optimizados por la MSR y analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se muestran en la tabla 9. Se observa que en los cinco puntos centrales la variabilidad en la cantidad de compuestos extraídos es mínima, por lo que el error esperado será menor en el análisis de superficie de respuesta.

Tabla 9. Arreglo estadístico establecido para las trece extracciones etanólicas y cantidad de compuestos obtenidos.

No. de Extracción	Temperatura °C	Tiempo (minutos)	Cantidad de compuestos Experimental	Cantidad de compuestos Predicho
	X1	X2		
1	54	90	65	66.830
2	54	180	61	64.994
3	74	90	80	80.505
4	74	180	81	83.669
5	50	135	60	56.812
6	78	135	81	79.687
7	64	71	80	79.280
8	64	199	84	80.219
9	64	135	73	75.6
10	64	135	76	75.6
11	64	135	75	75.6
12	64	135	75	75.6
13	64	135	79	75.6



Figura 57. Gráfica de las 13 extracciones etanólicas optimizadas por MSR y cantidad de compuestos obtenidos

Tabla 10. Análisis de Varianza de las extracciones etanólicas de *G. curtisii*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	de Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Modelo	670.49602	5	134.099	12.9331	0.002
Residual	72.5809	7	10.369		
Total	743.07692	12			
Temperatura	523.23674	1	523.23674	50.4631	0.0002*
Tiempo	0.88236	1	0.88236	0.0851	0.779
Temperatura*Tiempo	6.25	1	6.250	0.6028	0.4629
Temperatura*Temperatura	93.95217	1	93.95217	9.0611	0.0197*
Tiempo*Tiempo	29.95217	1	29.95217	2.8887	0.133
Residual	72.5809	7			
Total	743.07692	12			
R-square = 0.902324					
Adj. R-Square = 0.832555					

El ANDEVA (Tabla 10) es altamente significativo lo que representa que alguno de los factores evaluados, como la temperatura de extracción (F = 50.4631, P=0.0002) y su cuadrático Temperatura*Temperatura (F = 9.0611, P = 0.0197), tienen efecto sobre el rendimiento de extracción de compuestos y que el modelo de segundo orden es correcto para describirlo.

Tabla 11. Parámetros estimados de las extracciones etanólicas

Término	Estimado	Error estándar	t Radio	Prob>t
Intercepto	75.6	1.44	52.5	<0.0001
Temperatura (54,74)	8.0873	1.1384	7.1	0.0002
Tiempo (90,180)	0.3321	1.1384	0.29	0.779
Temperatura*Tiempo	1.25	1.61	0.78	0.4629
Temperatura*Temperatura	-3.675	1.2208	-3.01	0.0197
Tiempo*Tiempo	2.075	1.2208	1.7	0.133

Los resultados de la Tabla 11 muestran que el rendimiento de los compuestos de las extracciones etanólicas puede ser representado por la siguiente ecuación del modelo ajustado, expresado en términos de variables codificadas:

$$Y = 75.6 + 8.0878X_1 + 0.3321X_2 - 3.675X_1^2 + 2.075X_2^2$$

Donde:

Y = Rendimiento (Cantidad de compuestos), X_1 = Temperatura (°C) y X_2 = Tiempo (minutos)

Los resultados anteriores indican que el modelo completo de segundo orden es significativo por lo que se rechaza la hipótesis:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_{11} = \beta_{22} = \beta_{12} = 0$$

La probabilidad de que los efectos sean iguales con cero es pequeña (0.0020); por tanto en este experimento, los tiempos y las temperaturas usadas solas o combinadas, presentan un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción y por tanto los óptimos encontrados son confiables. La $R^2 = 0.9023$ y es altamente significativa, la R^2 ajustada = 0.8325 nos indica que el modelo explica el 83.25% de lo ocurrido experimentalmente, lo que significa un adecuado ajuste.

Los altos valores de los coeficientes de rendimiento muestran una estrecha concordancia entre los resultados experimentales obtenidos y los valores predichos por los modelos polinómicos. Cuando son cercanos los valores de R (coeficiente de correlación múltiple) a 1; mejor será la correlación entre los valores experimentales y predichos.

En la tabla 12 se observa que la temperatura es un factor importante ($P < 0.0002$) y el tiempo no ($P = 0.779$). Otro efecto significativo en el rendimiento es el cuadrático Temperatura*Temperatura ($P = 0.0197$).

Tabla 12. Análisis de los Efectos para las extracciones etanólicas de *G. curtisii*

Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
Temperatura (54,74)	1	1	523.2367	50.4631	0.0002*
Tiempo (90,180)	1	1	0.88236	0.0851	0.779
Temperatura*Tiempo	1	1	6.25	0.6028	0.4629
Temperatura*Temperatura	1	1	93.95217	9.0611	0.0197*
Tiempo*Tiempo	1	1	29.95217	2.8887	0.133

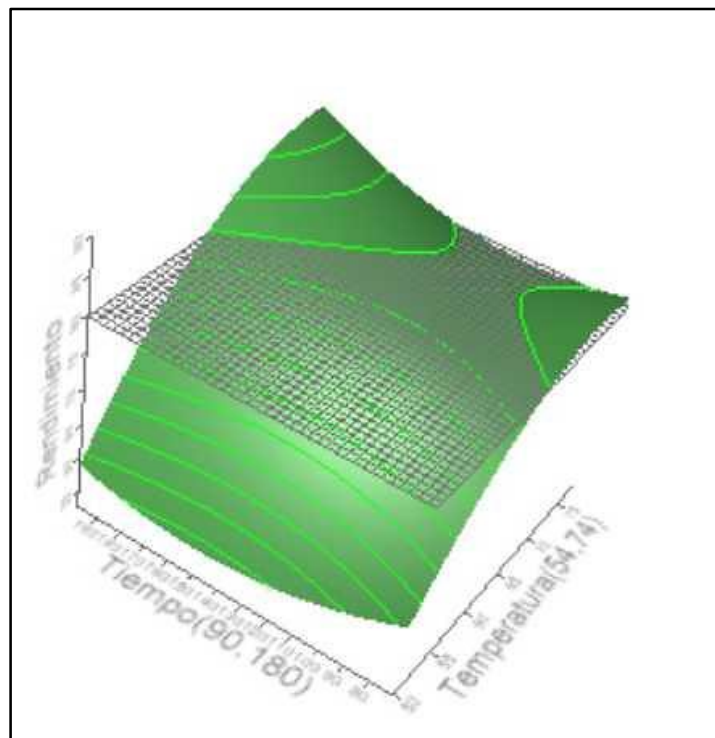
En el siguiente resultado (Tabla 13) se encontró un máximo en la superficie de respuesta y los valores codificados y decodificados de Temperatura y Tiempo donde se alcanza este máximo son 1.03375 (74.3375°C) y -0.391396 (117.38717°C) respectivamente.

Tabla 13. Valores Óptimos encontrados para la extracción etanólica de compuestos de *G. curtisii*

Variable	Valor Crítico	Valor Decodificado
Temperatura (°C)	1.03375	74.3375
Tiempo (min)	-0.391396	117.38
La solución es una silla de montar		
Rendimiento de Compuestos	79.715137	

Gráficas de superficie de respuesta extracción etanólica.

Como se observa en el análisis anterior, los modelos son altamente significativos para la respuesta rendimiento por lo que se construyó la superficie de respuesta para definir las regiones de interés (Figuras 58 y 59)

**Figura 58.** Gráfico de Superficie de Respuesta Tiempo y Temperatura versus Rendimiento

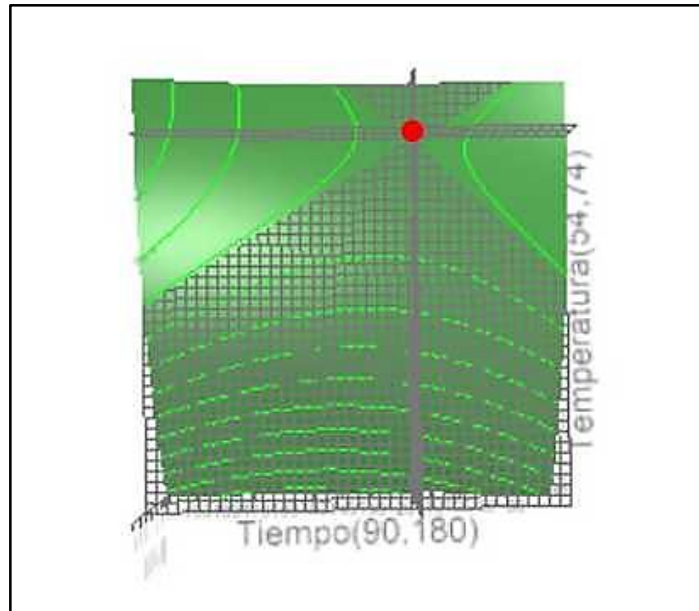


Figura 59. Curvas de Contorno y rendimiento óptimo de la extracción etanólica.

En las Figuras 60 a 62, se observan las gráficas de contorno que permiten definir las condiciones óptimas para maximizar los rendimientos, se observa que cuando los valores de Temperatura oscilan entre 60°C y 70°C, el rendimiento de compuestos aumenta de 72 a 79 compuestos. Con respecto al factor tiempo, lo cual no afecta el rendimiento de compuestos.

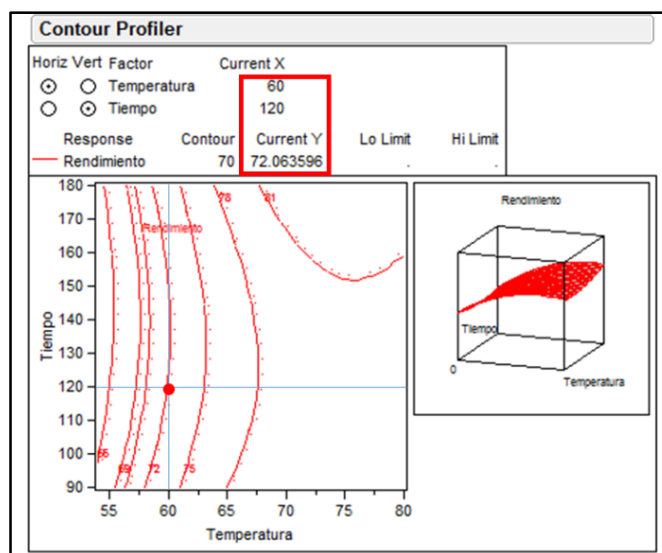


Figura 60. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 60°C y tiempo de 120 min

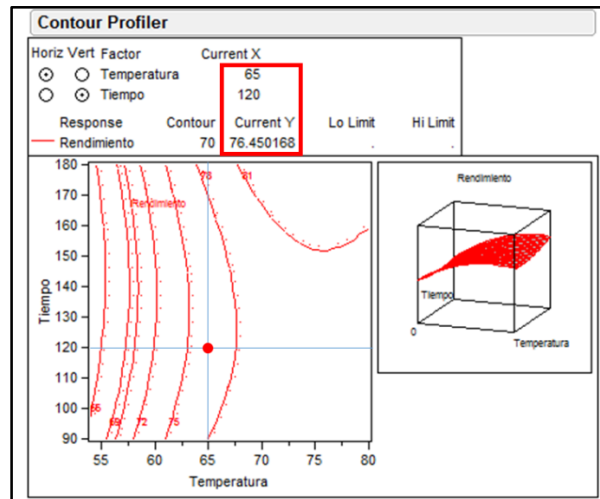


Figura 61. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 65°C y tiempo de 120 min

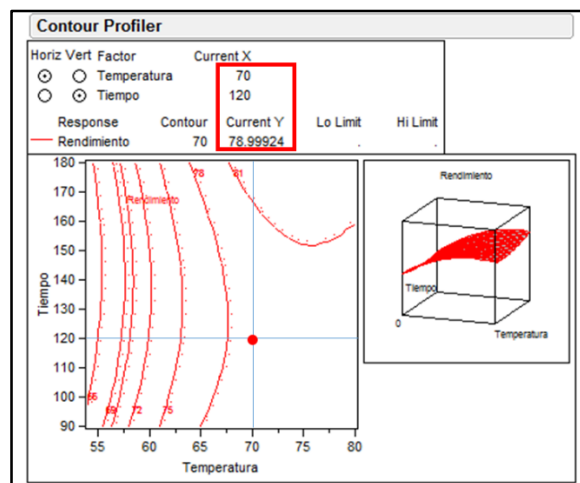


Figura 62. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 70°C y tiempo de 120 min

De acuerdo a diferentes autores, una temperatura más elevada puede incrementar el contenido de compuestos al aumentar la solubilidad, la velocidad de difusión, la tasa de extracción, reducir la viscosidad del solvente y la tensión superficial (Ju & Howard, 2003; Shi et al. 2003). Sin embargo, elevar más la temperatura de extracción podría causar la degradación de los compuestos, debido a la interferencia de la estabilidad del compuesto por degradación química y enzimática, o a la reacción con otros componentes del vegetal (*Ganoderma*) reduciendo la eficiencia de la extracción (Durling et al., 2007; Al-Farsi & Lee, 2008).

Un mayor rendimiento de compuestos en el extracto etanólico (84 compuestos) se observa a una temperatura de 77.5°C, sin embargo es necesario tiempos prolongados de proceso de hasta 180 minutos (Figura 63), por lo que el óptimo obtenido de 79 compuestos se alcanza a una

Temperatura de 74°C durante 117 minutos (Figura 64), siendo estos parámetros adecuados en función de minimizar los costos y tiempos de proceso.

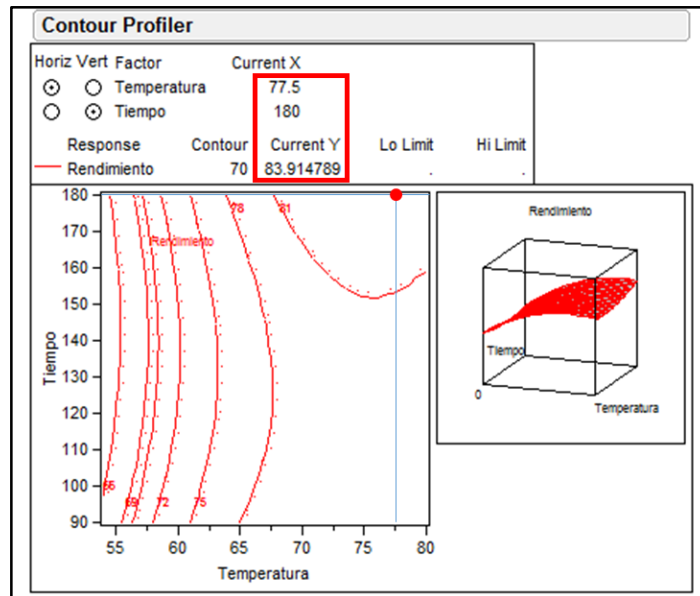


Figura 63. Gráfico de Contornos extracción etanólica a una Temperatura de 77.5°C y tiempo de 180 min

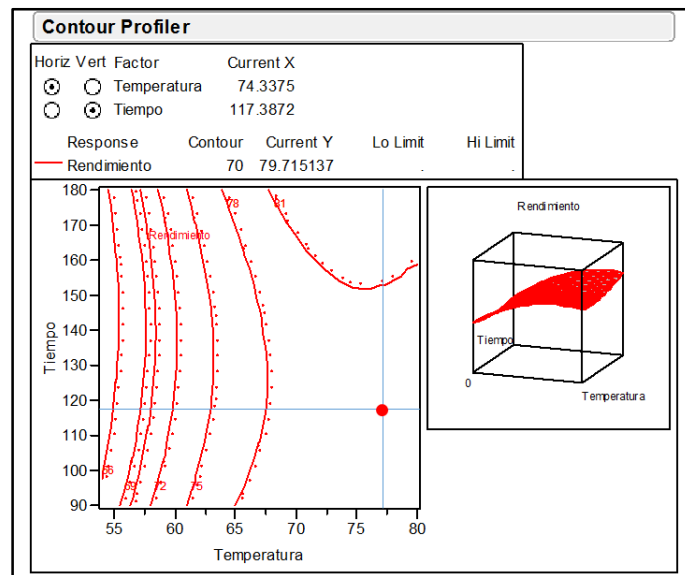


Figura 64. Gráfico de Contornos extracción etanólica en los puntos óptimos de Temperatura 74°C y tiempo de 117 min

9.7.1 Cromatografía de Capa Fina de alta Eficiencia (HPTLC) de compuestos terpénicos en extracciones alcohólicas optimizadas por MSR.

En la figura 65 se presenta la placa de HPTLC de las 13 extracciones por calentamiento directo optimizadas por la MSR. La cantidad de señales que representan a los compuestos terpénicos es similar en los trece tratamientos. Por lo que se usó la CG/MS para obtener el rendimiento de los compuestos presentes en cada una de las trece extracciones etanólicas.

Es posible distinguir al menos tres compuestos terpénicos que presentan actividad biológica reportados por Wagner en *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines* (2011) para *Ganoderma lucidum* analizados por HPTLC utilizando el mismo sistema de disolvente y revelador; **ácido ganodérico A** ($R_f = 0.46$), **ácido ganodérico C₂** ($R_f = 0.3$) y **Ergosterol** ($R_f = 0.93$).

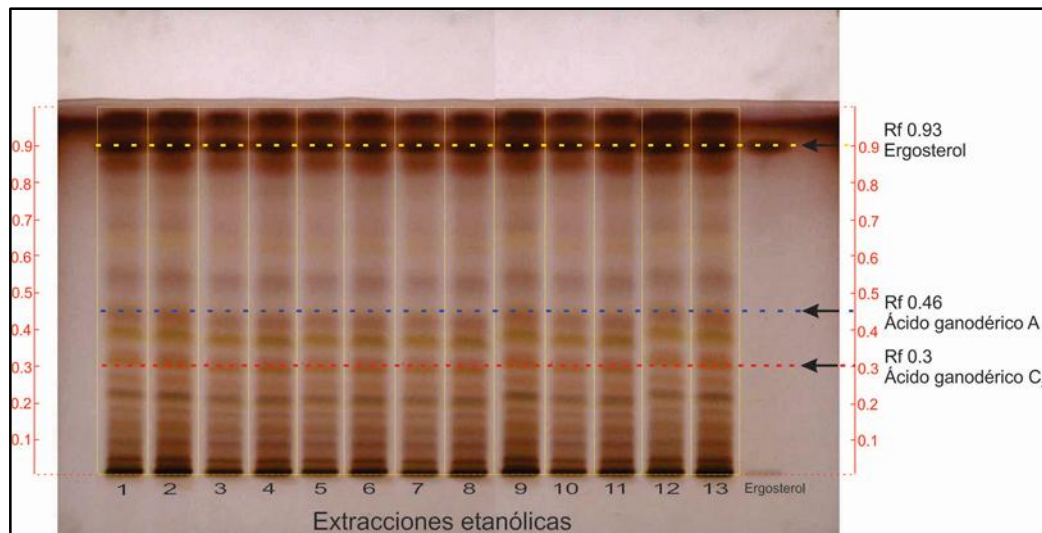


Figura 65. HPTLC de las extracciones alcohólicas optimizadas por MSR

Aunque en este trabajo no se realizaron pruebas sobre la actividad biológica del ergosterol y de los ácidos ganodéricos A y C₂, se consideró importante hacer la referencia a las investigaciones realizadas a estos compuestos en relación a su función biológica.

Paterson (2006) reporta la actividad biológica y medicinal de los ácidos ganodéricos A y C en actividades de hepatoprotección, propiedades antioxidantes, inhibición de la absorción de colesterol, actividad antiviral HIV e inducción de la apoptosis.

Trigos y Suárez (2011) reportan que el ergosterol ha sido estudiado en la Inhibición de la angiogénesis inducida por tumores sólidos, inhibición del crecimiento del cáncer de vejiga en ratas, inhibición de la peroxidación lipídica dependiente del hierro de las membranas celulares, reducción del dolor asociado a la inflamación, reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y actividad antimicrobiana.

9.7.2 Compuestos identificados en las extracciones etanólicas optimizadas por MSR.

Las trece extracciones etanólicas optimizadas por MSR se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por impacto electrónico. En la tabla 14 se presentan algunos de los compuestos identificados así como las referencias donde se mencionan sus propiedades medicinales o actividad biológica, principalmente antioxidante, antiinflamatoria y antibacterial. Estos resultados confirman la presencia de compuestos con actividad biológica y medicinal que se han reportado en investigaciones realizadas por otros autores.

Tabla 14. Compuestos identificados en las extracciones etanólicas optimizadas por MSR

Tipo de Compuesto	Nombre del compuesto	Referencia
Ácidos Grasos	Ácido oleico	Chan, 2007; Wasser, 2005; Lv, 2012; Gao, 2012; Chen, 2013.
	Ácido linoleico	
	Ácido palmítico	
	Ácido esteárico	
Derivados de Ergostanol	Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol)	Trigos y Suárez, 2011.
	Ergosta-7,22-dien-3 β -ol	
Azúcares	α -D-glucopiranosida	Wasser, 2005; Villares, 2012; Xie, 2012.
	D-galactosa	
	β -D-glucopiranososa	
	D-manitol	
	Galactopiranososa,	
	D-Trehalosa,	
	Xilitol,	
Ácidos carboxílicos	Arabitol	Wasser, 2005; Villares, 2012; Xie, 2012; Grimes, 2007; Draelos, 2007
	Ácido galactónico	
	Ácido glucónico	
	Ácido glucurónico,	
Hidrocarburos	Ácido azelaico	Kamiyama, 2013; Asgarpanah, 2013
	Eicosano	
	Hentriacontano	
	Heneicosano	
Aromáticos	Ácido benzoico	Kamiyama, 2013

9.8 Optimización de la extracción acuosa de *Ganoderma curtisii*.

Los efectos de las variables de proceso, temperatura de extracción (72-92°C) y tiempo de extracción (90-180 minutos) fueron investigados.

En la tabla 15 se muestran los trece tratamientos de extracción con las temperaturas y tiempos establecidos en el diseño estadístico y el rendimiento obtenido de polisacáridos crudos para cada uno de ellos (Figura 66).

Tabla 15. Arreglo estadístico establecido para las trece extracciones acuosas y el rendimiento obtenido de polisacáridos crudos.

No. de Extracción	Temperatura °C X1	Tiempo (minutos) X2	Rendimiento de polisacáridos crudos	Rendimiento de polisacáridos crudos
			(mg) Experimental	(mg) Predicho
1	72	90	113.45	105.361
2	72	180	92.1	83.386
3	92	90	99.05	89.088
4	92	180	118.8	108.213
5	68	135	81.6	89.613
6	96	135	85	95.661
7	82	71	92.5	101.395
8	82	199	89.6	99.379
9	82	135	103.3	105.08
10	82	135	108.3	105.08
11	82	135	106.3	105.08
12	82	135	104.1	105.08
13	82	135	103.4	105.08

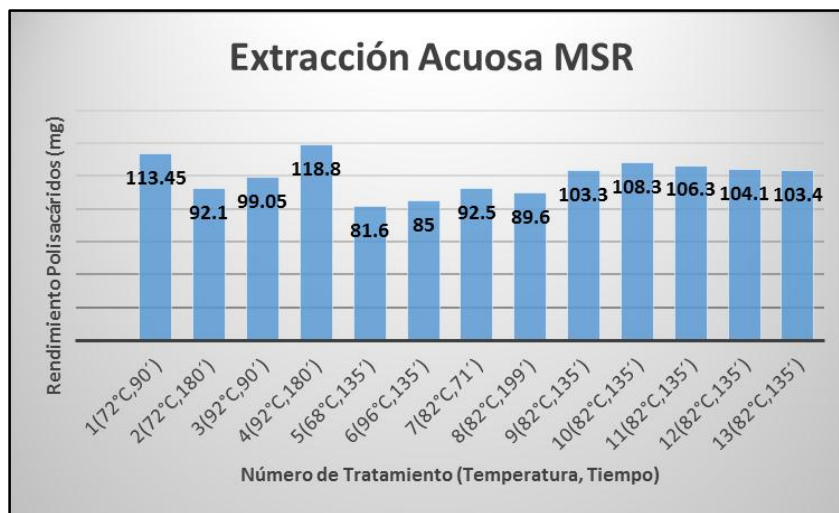


Figura 66. Gráfica de las 13 extracciones acuosas optimizadas por MSR y cantidad de polisacáridos obtenidos

Tabla 16. Análisis de Varianza de las extracciones acuosas de *G. curtisii*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P	Valores Codificados
Modelo	748.8673	5	149.773	1.4479	0.3161	
Residual	724.1169	7	103.445			
Total	1472.9842	12				
Temperatura	36.58685	1	36.58685	0.3537	0.5708	-0.057483
Tiempo	4.06299	1	4.06299	0.0393	0.8485	-0.27774
Temperatura*Tiempo	422.3025	1	422.3025	4.0824	0.0831	
Temperatura*Temperatura	269.24488	1	269.24488	2.6028	0.1507	
Tiempo*Tiempo	38.29488	1	38.29488	0.3702	0.5621	
Residual	724.1169	7				
Total	1472.9842	12				
R-square = 0.508401						
Adj. R-Square = 0.15726						

El ANDEVA (Tabla 16) no es significativo (1.4479, P = 0.3161) lo que representa que alguno de los factores evaluados no tienen efecto sobre el rendimiento y el modelo de segundo orden no es apropiado para describirlo.

De los resultados mostrados en la Tabla 17 se obtiene que el rendimiento de los compuestos obtenidos de las extracciones acuosas puede ser representado por la siguiente ecuación del modelo ajustado, expresado en términos de variables codificadas:

Tabla 17. Parámetros estimados de las extracciones acuosas

Término	Estimado	Error estándar	t Radio	Prob>t
Intercepto	105.08	4.5485	23.1	<0.0001
Temperatura (54,74)	2.1385	3.5959	0.59	0.5708
Tiempo (90,180)	-0.712652	3.5959	-0.2	0.8485
Temperatura*Tiempo	10.275	5.0854	2.02	0.0831
Temperatura*Temperatura	-6.22125	3.8561	-1.61	0.1507
Tiempo*Tiempo	-2.34625	3.8561	-0.61	0.5621

$$Y = 105.08 + 2.1385X_1 - 0.7126X_2 - 6.2212X_1^2 - 2.3462X_2^2$$

Donde:

Y= Rendimiento (Polisacáridos mg), X_1 = Temperatura (°C) y X_2 = Tiempo (minutos).

Los resultados del análisis de varianza, indican que el efecto de la temperatura, el efecto del tiempo y las interacciones (Temperatura*Tiempo) no son significativas, esto es que son igual a cero.

Así mismo, de los resultados anteriores se puede inferir que el modelo completo de segundo orden no es significativo, esto es, se acepta la hipótesis:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_{11} = \beta_{22} = \beta_{12} = 0$$

Como el valor de F es 1.4479 (Tabla 9), la probabilidad de que los efectos sean iguales con cero es grande (0.3161); por tanto en este experimento, los tiempos y las temperaturas usadas solas o combinadas no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento y por tanto los óptimos encontrados no son confiables.

En la tabla siguiente (Tabla 18) se observa que los factores no presentan significancia ($P > 0.05$) y que las variables solas o combinadas no presentan efectos significativos en el rendimiento.

Tabla 18. Análisis de los Efectos para las extracciones acuosas de *G. curtisii*

Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
Temperatura (72,92)	1	1	36.58685	0.3537	0.5708
Tiempo (90,180)	1	1	4.06299	0.0393	0.8485
Temperatura*Tiempo	1	1	422.3025	4.0824	0.0831
Temperatura*Temperatura	1	1	269.24488	2.6028	0.1507
Tiempo*Tiempo	1	1	38.29488	0.3702	0.5621

El siguiente resultado (Tabla 19) nos muestra que se encontró un máximo en la superficie de respuesta y los valores codificados y decodificados de Temperatura y Tiempo donde se alcanza este máximo son -0.057486 (81.4251°C) y -0.27774 (122.5017°C) respectivamente.

Tabla 19. Valores Óptimos encontrados para la extracción de Polisacáridos de *G. curtisii*

Variable	Valor Crítico	Valor Decodificado
Temperatura (°C)	-0.057486	81.425165
Tiempo (min)	-0.27774	122.5017
La solución es una silla de montar		
Rendimiento de Polisacáridos mg	105.1175	

La tendencia que se observa en los resultados obtenidos de la optimización de la extracción acuosa de *Ganoderma curtisii* es que el rendimiento de polisacáridos se mantiene entre 105-106 mg en un

rango de temperaturas entre 80°C y 90°C aun cuando se extiendan los tiempos de extracción hasta 160 min., por lo que no es recomendable elevar la temperatura y el tiempo de extracción, ya que el rendimiento de polisacáridos no aumentará (Figura 67).

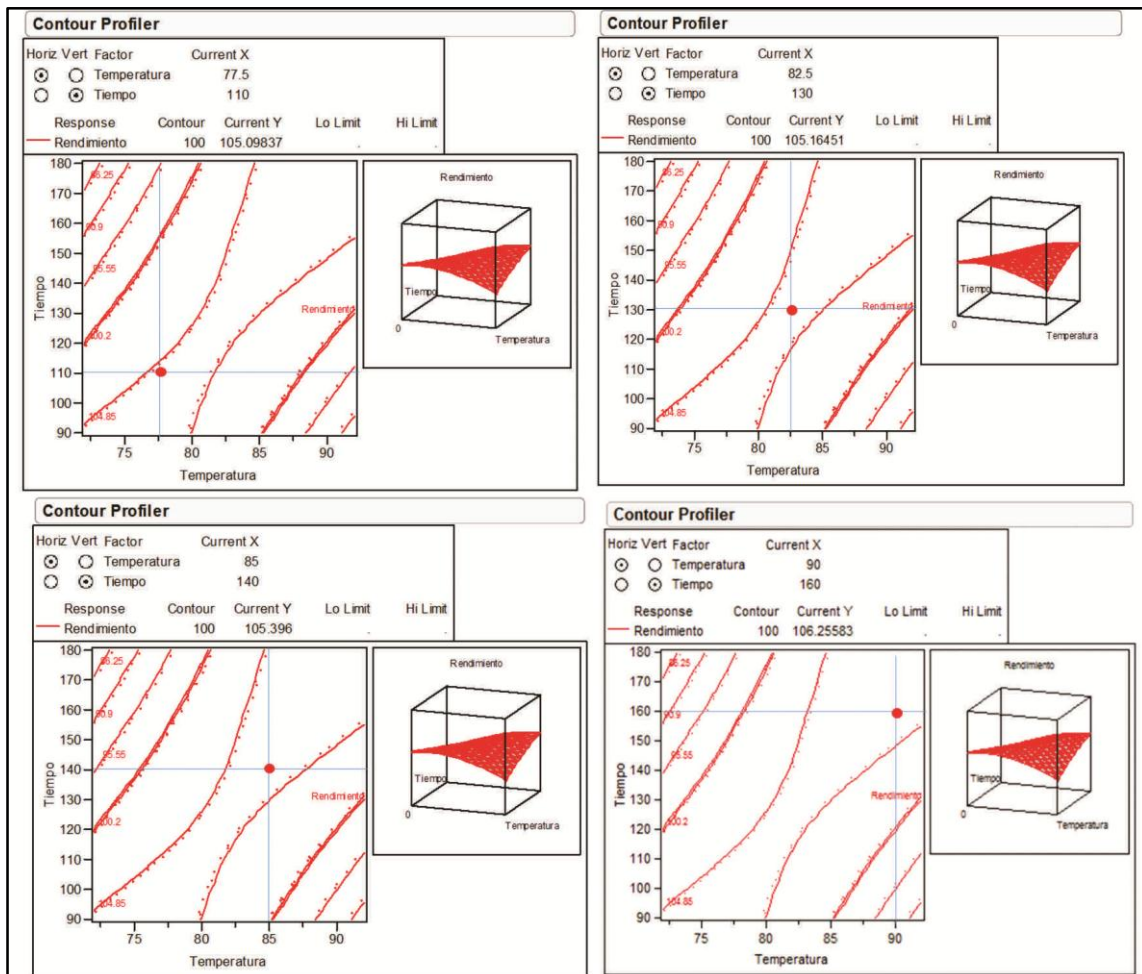


Figura 67. Gráficos de Contornos extracción acuosa a Temperaturas entre 80-90°C y tiempos entre 110-160 min

Superficie de respuesta Extracción acuosa.

En la Figura 68, se observa que cuando los valores de temperatura aumentan de 72°C a 92°C, se incrementa la cantidad de polisacáridos. Sin embargo al aumentar el tiempo de proceso de 90 a 160 minutos con una temperatura de 80°C no hay un aumento significativo de polisacáridos manteniéndose estos en 104.8 mg a 80°C y 90 minutos (Figura 69) y en 102.1 mg a 80°C y 160

minutos (Figura 70). Al aumentar el tiempo de extracción hasta 180 minutos, el rendimiento de polisacáridos disminuye hasta valores de 99 mg (Figura 71).

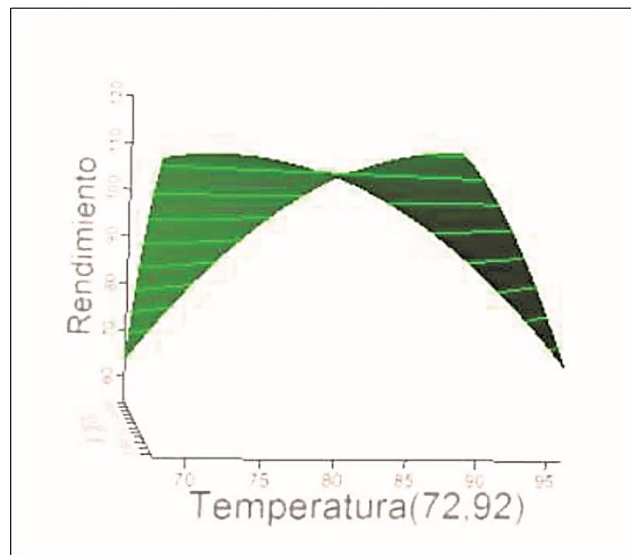


Figura 68. Gráfico de Superficie de Respuesta Tiempo y Temperatura versus Rendimiento Polisacáridos

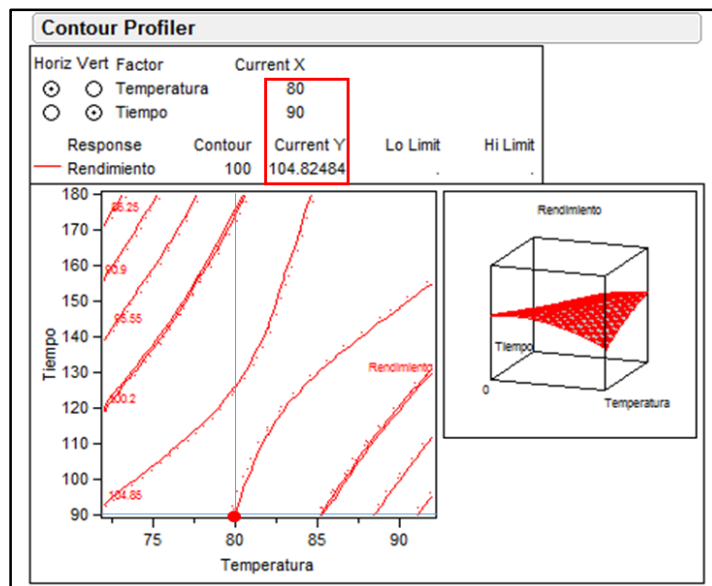


Figura 69. Gráfico de Contornos extracción acuosa a una Temperatura de 80°C y tiempo de 90 min

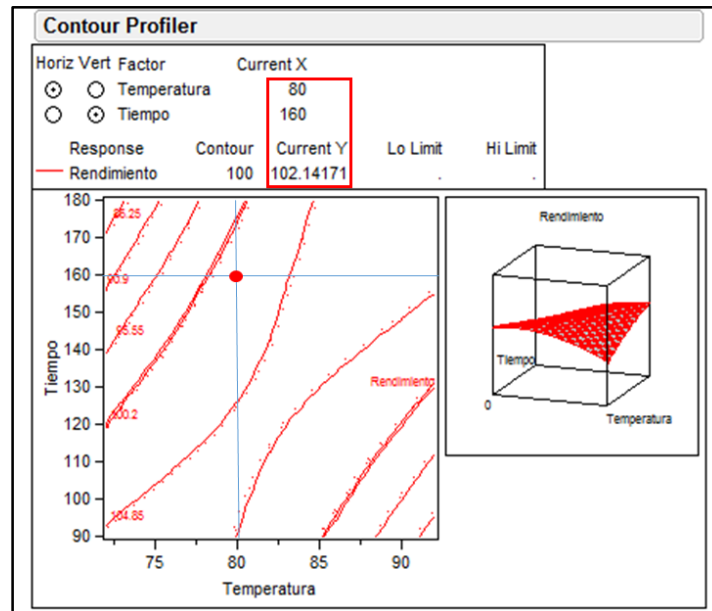


Figura 70. Gráfico de Contornos extracción acuosa a una Temperatura de 80°C y tiempo de 160 min

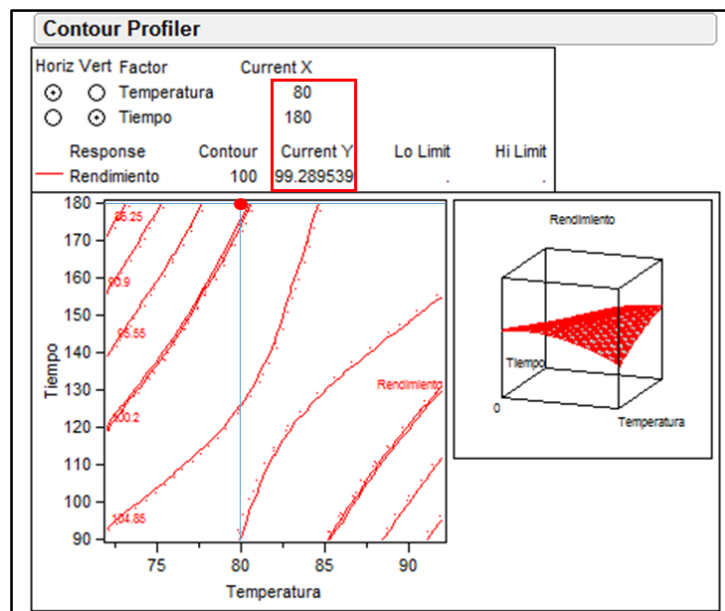


Figura 71. Gráfico de Contornos extracción acuosa a una Temperatura de 80°C y tiempo de 180 min

En un cierto periodo de tiempo (94-122 min), a mayor temperatura (hasta 82°C), hay una mayor disolución de polisacáridos. La solución de polisacáridos está en equilibrio, pero cuando el tiempo de extracción se extiende el contenido de polisacáridos disminuye. Esta disminución de

polisacáridos al aumentar el tiempo de extracción puede deberse a la degradación térmica de los polisacáridos extraídos (Shiyu Tan; et al, 2011). Con el aumento de la temperatura, la cantidad de polisacáridos aumenta debido a la solubilidad del polisacárido, pero si la temperatura continúa aumentando ésta afecta la actividad fisiológica de los polisacáridos causando su degradación.

Un mayor rendimiento de polisacáridos en el extracto acuoso obtenido experimentalmente (118.8 mg ó 2.36%) se observa a una temperatura de 92°C, sin embargo es necesario un tiempo largo de proceso de hasta 180 minutos, por lo que el óptimo obtenido de 105 mg ó 2.1% se alcanza a una Temperatura de 81.4°C durante 122 minutos (Figuras 72, 73 y 74). Estos parámetros de tiempo y temperatura permiten obtener un buen rendimiento de polisacáridos sin incrementar el costo de producción empleando tiempos largos de proceso y temperaturas elevadas que pueden degradar los polisacáridos.

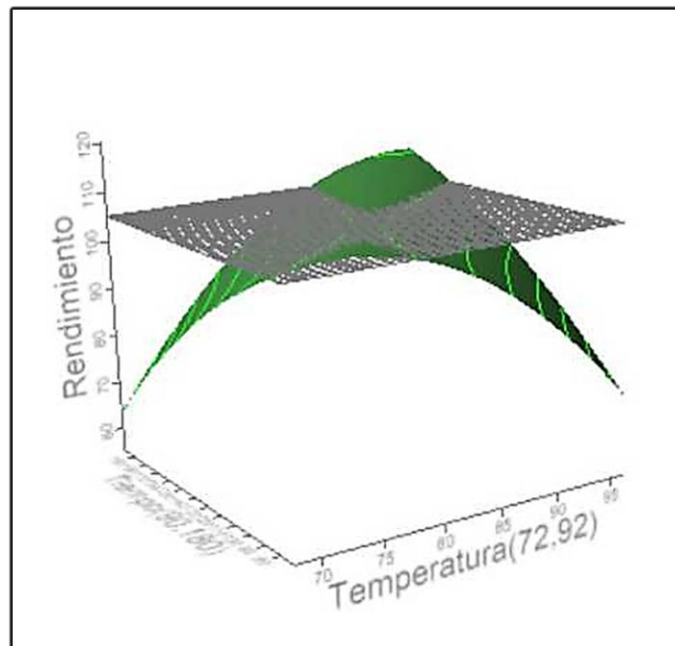


Figura 72. Gráfico de Superficie de Respuesta de las extracciones acuosas

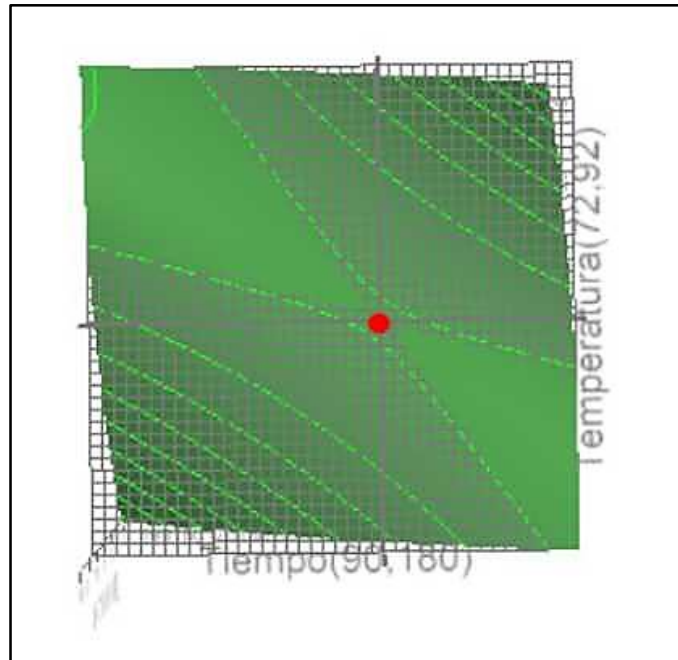


Figura 73. Localización del punto óptimo de rendimiento en el Gráfico de Superficie de Respuesta

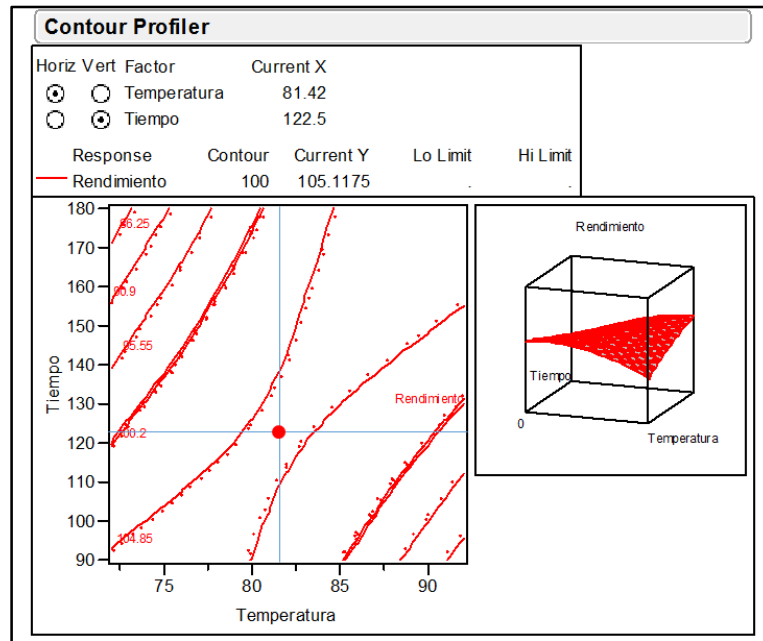


Figura 74. Gráfico de Contornos extracción acuosa en los puntos óptimos de Temperatura 81°C y tiempo de 122.5 min

Los resultados anteriores concuerdan con los reportados por Zhao et al. (2010) de 2.07% para la extracción ultrasónica-ácida de Polisacáridos de *G. lucidum*; Chung-wah Ma (2013) de 2.78% para la extracción ultrasónica a 320 W de polisacáridos de *G. lucidum*, Sheng-quan H (2010) de 1.99%-3.08% para la extracción ultrasónica y por microondas de polisacáridos de *G. lucidum* y Huang Pu et al. (2007) de 2.64% para la extracción por Microondas de polisacáridos obtenidos de las esporas de *G. atrum*.

Rendimientos mayores de polisacáridos se han reportado utilizando extracciones alcalinas de *G. lucidum*, como la extracción reportada por Sheng-Quan H et al. (2010) de 8.30% de polisacáridos y por Gao-Qiang Liu et al. (2011) de 5.9% de polisacáridos.

9.9 Capacidad Antioxidante de extractos hidroalcohólico, etanólico y polisacáridos de *G. curtisii*

La actividad antioxidante de cada tipo de extracto expresada como porcentaje de inhibición se muestra en la Tabla 20. Los resultados indican que los extractos fueron capaces de atrapar radicales DPPH y que dicha capacidad es dependiente de la concentración. Los extractos hidroalcohólico y etanólico no presentan diferencias estadísticas en sus valores del porcentaje de inhibición en todas sus concentraciones (0.1-1 mg/ml). A concentraciones de 0.4 mg/ml no hay diferencias significativas en los porcentajes de inhibición de los extractos hidroalcohólico, etanólico y de los polisacáridos, siendo de 74.05±1.38 para el extracto etanólico, 73.64±1.30 para el extracto hidroalcohólico y 73.62±2.59 para los polisacáridos. En las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.6, 0.8 y 1 mg/ml si hay diferencias significativas en los valores de porcentaje de inhibición de los polisacáridos con respecto a los extractos hidroalcohólico y etanólico de *G. curtisii*. El máximo porcentaje de inhibición para los extractos etanólico, hidroalcohólico y los polisacáridos a una concentración de 1 mg/ml, fue de 90.59±1.76 %, 89.10±0.66 y de 83.09±1.82 % respectivamente, mientras que para el ácido ascórbico fue de 96.4±0.66 %.

Tabla 20. Resultados % de inhibición de extractos de *G. curtisii*.

Concentración mg/ml	% de Inhibición					
	0.1 R ² = 0.993 P<0.0001	0.2 R ² = 0.993 P<0.0001	0.4 R ² = 0.977 P<0.0001	0.6 R ² = 0.958 P<0.0001	0.8 R ² = 0.914 P<0.0001	1 R ² = 0.936 P<0.0001
Polisacáridos <i>G. curtisii</i>	32.89 ± 3.49 c	50.21±2.57 c	73.62±2.59 b	78.48±2.44 c	83.19±2.91 c	83.09±1.82 c
Extracto Hidroalcohólico <i>G. curtisii</i>	67.85 ± 0.82 b	70.01 ± 1.04 b	73.64 ± 1.30 b	84.16 ± 1.10 b	87.36 ± 0.56 b	89.10 ± 0.66 b
Extracto Etanólico <i>G. curtisii</i>	65.57 ± 1.31 b	68.38±0.99 b	74.05±1.38 b	85.35±1.23 b	88.54±1.19 b	90.59±1.76 b
Ácido ascórbico	95.78 ± 0.75 a	96.17±0.38 a	96.21±0.24 a	96.36±0.15 a	96.46±0.26 a	96.4±0.66 a

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa en los resultados.

Los valores fueron expresados como las medias ± SD de tres determinaciones por triplicado.

Los extractos hidroalcohólico, etanólico y los polisacáridos de *G. curtisii* han demostrado ser capaces de reducir el radical estable DPPH que presenta una coloración morada a su forma reducida de coloración amarillo. El porcentaje de inhibición de los extractos de *Ganoderma curtisii* aumenta en forma directamente proporcional a las concentraciones de estos. Los valores obtenidos concuerdan con lo reportado por otros autores para especies de *Ganoderma*. Kozarski (Kozarski M et al, 2012) reporta valores de porcentajes de inhibición de 77.5-81.9 % para el hongo *G.*

applanatum para concentraciones que van de 0.1 a 1 mg/ml. Min Shi (Min Shi et al, 2013) reporta porcentajes de inhibición de 88.38 % para polisacáridos de *G. lucidum* a una concentración de 1.25 mg/ml.

9.9.1 Valores de IC₅₀ en las propiedades antioxidantes

Los valores de IC₅₀ para los extractos Hidroalcohólico y etanólico de *G. curtisii* fueron menores a 0.1 mg/ml, mientras que para los polisacáridos fue de 0.2 mg/ml. Estos valores nos indican que los extractos hidroalcohólico y etanólico inhiben el 50% de los radicales DPPH a concentraciones menores de 0.1 mg/ml, mientras que se requieren concentraciones de 0.2 mg/ml de los polisacáridos para inhibir los radicales DPPH. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kozarski M et al, 2012 y Saltarelli R. et al, 2009 para polisacáridos de *G. lucidum*.

En la tabla 21 se muestran los valores comparativos de porcentaje de inhibición y valores de IC₅₀ para extractos de *Ganoderma curtisii* evaluados en el presente trabajo así como los resultados reportados por otros autores para diferentes especies de *Ganoderma*.

Tabla 21. Valores comparativos de porcentaje de inhibición e IC₅₀ para extractos de *Ganoderma*.

Muestra	Especie	Concentración mg/ml	% de inhibición DPPH	Valor IC ₅₀ mg/ml	Referencia
Polisacáridos		0.1-1	32.89-83.09	0.2	
Extracto Etanólico	<i>G. curtisii</i>	0.1-1	65.57-90.59	<0.1	Presente estudio
Extracto Hidroalcohólico		0.1-1	67.85-89.10	<0.1	
Polisacáridos	<i>G. applanatum</i>	0.1-1	77.5-81.9	<0.1	Kozarski M et al, 2012
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	1.5	47.3-63.7	No reportado	Chung-wah Ma et al, 2013
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	2.5	94.8	0.1	Kozarski M et al, 2012
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	--	--	0.36	Xingyi Zhu et al, 2012
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	0.64	67.6-74.4	No reportado	Jeng-Leun Mau et al, 2002
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i> (Italia)	0.5	60	0.23±0.05	Saltarelli R. et al, 2009
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i> (China)	1.2	65	0.69±0.02	Saltarelli R. et al, 2009
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	--	--	2	Ti-Qiang Chen et al, 2014
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	1.25	91.48	0.23	Min Shi et al, 2014
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	1.25	88.38	No reportado	Min Shi et al, 2013
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	1.5	63.7	No reportado	Liuping Fan et al, 2012
Polisacáridos	<i>G. tsugae</i>	5-20	58.4-93.7	No reportado	Yu-Hsiu Tseng et al, 2008
Extracto acuoso	<i>G. Tsugae</i>	--	--	0.4	Noorlidah A. et al, 2012
Extracto metanólico	<i>G. tsugae</i>	0.5	45	No reportado	Mau et al, 2002

9.10 Contenido de Compuestos Fenólicos Totales

El contenido de compuestos fenólicos en los extractos de *Ganoderma curtisii* fue de 49.1467 ± 0.1692 mg GAE/gr para el extracto etanólico y de 35.6313 ± 0.1868 mg GAE/gr para el extracto hidroalcohólico. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores para valores de GAE en hongo *Ganoderma*. En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos de GAE para los extractos de *Ganoderma curtisii* y los resultados reportados por otros autores para diferentes especies de *Ganoderma*. Heleno et al, (2012) reportan un valor de 47 mg GAE/gr para el extracto hidroalcohólico de *G. lucidum* y Cilerdzic et al, (2014) reportan valores de 33.42-52.15 mg GAE/gr para extractos etanólicos de *G. lucidum*.

Tabla 22. Valores comparativos de GAE para extractos de *Ganoderma*

Muestra	Compuestos Fenólicos mg GAE/g	Referencia
Extracto Etanólico <i>G. curtisii</i>	49.15±0.17	Presente estudio
Extracto Hidroalcohólico <i>G. curtisii</i>	35.63±0.19	Presente estudio
Extracto Metanólico <i>G. applanatum</i>	71	Nagaraj et al, 2014
Extracto acuoso <i>G. applanatum</i>	47	Kozarski M et al, 2012
Extracto Hidroalcohólico <i>G. lucidum</i>	55.53	Heleno et al, 2012
Extracto etanólico <i>G. lucidum</i>	71.43	Imtiyaz et al, 2014
Extracto etanólico <i>G. lucidum</i>	52.15	Cilerdzic et al, 2014
Extracto etanólico <i>G. lucidum</i>	33.42	Cilerdzic et al, 2014
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i>	33	Kozarski M et al, 2012
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i>	43.14	Abul et al, 2013
Extracto acuoso <i>G. lucidum</i>	63.51	Noorlidah A. et al, 2012

En la tabla 23 se muestran las correlaciones del porcentaje de inhibición de los extractos hidroalcohólico y etanólico de *G. curtisii* y la cantidad de compuestos fenólicos mg GAE/g. Se observa una relación directamente proporcional del porcentaje de inhibición con la cantidad de compuestos fenólicos mg GAE/g. Figuras 75 y 76. Varios estudios confirman la relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (Cheung, 2003; Dubost, 2007). Una mayor capacidad antioxidante de los extractos hidroalcohólico y etanólico puede ser atribuida a su contenido de compuestos fenólicos.

Tabla 23. Correlación entre % de Inhibición de los extractos de *G. curtisii* y su contenido de Compuestos fenólicos mg GAE/g

	% de inhibición DPPH	
	Ecuación Lineal	R ²
Compuestos fenólicos en Extracto Hidroalcohólico mg GAE/gr	Y = 0.7197x + 63.6243	0.9600
Compuestos fenólicos en Extracto Etanólico mg GAE/gr	Y = 0.5811x + 62.8362	0.9605

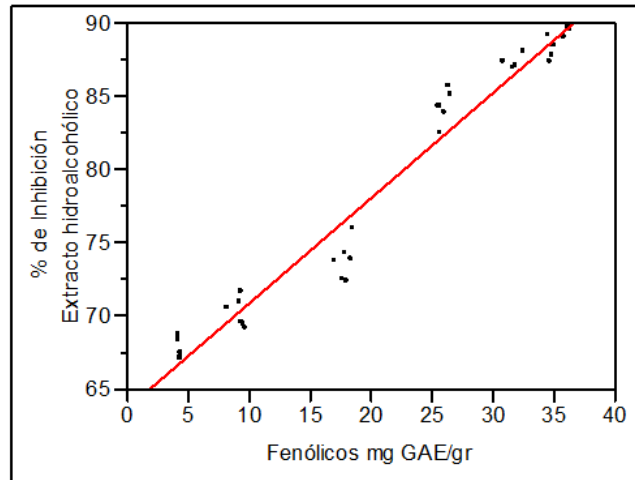


Figura 75. Correlación de Compuestos fenólicos y porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico

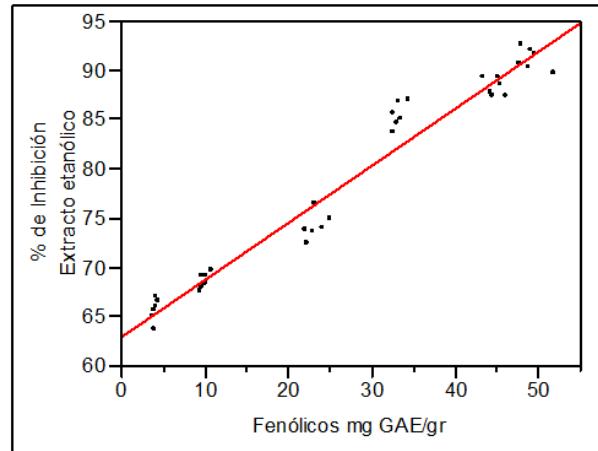


Figura 76. Correlación de Compuestos fenólicos y porcentaje de inhibición del extracto etanólico

10. CONCLUSIÓN

El hongo se describió como *Ganoderma curtisii*, una especie que presenta dos características distintivas como son el contexto dúplex y las capas resinosas que no cambian con la edad del ejemplar. El análisis de metales indica cantidades por debajo de la dosis letal (LD) y de la ingesta Diaria aceptable (ADI) de plomo, cromo, cadmio, níquel, zinc, arsénico, cobre, fierro, calcio, magnesio y potasio.

El método de extracción acuosa del hongo *Ganoderma curtisii* por calentamiento directo permite obtener el doble de polisacáridos crudos que mediante la extracción acuosa por Soxhlet.

En las extracciones acuosas se identifican monosacáridos como galactosa, xilosa y glucosa, este último es el monosacárido más importante que forma parte de los polisacáridos del hongo del género *Ganoderma*. La extracción alcohólica por calentamiento directo presentó mayor cantidad de compuestos que la extracción por Soxhlet. Entre los compuestos extraídos se identificaron ácidos grasos: oleico, linoleico, palmítico y esteárico; derivados de ergosterol: ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, ergosta-7,22-dien-3 β -ol, azúcares como, α -D-glucopiranosida, β -D-glucopiranososa, galactopiranososa, D-galactosa, D-manitol, D-Trehalosa y ácidos carboxílicos como ácido galactónico, ácido glucónico y ácido glucurónico. Por lo anterior, se concluye que el método de extracción con mayor rendimiento para la obtención de compuestos bioactivos de *G. curtisii* fué por calentamiento directo, utilizando los solventes agua y alcohol de forma independiente y realizando un máximo de dos extracciones por muestra de hongo.

Los valores de temperatura y tiempo de la extracción etanólica que permiten una mayor extracción de compuestos terpénicos fueron 74°C y 117 minutos con un rendimiento de 79 compuestos.

Se identificaron 3 compuestos terpénicos con actividad biológica: ácido ganodérico A, ácido ganodérico C₂ y ergosterol. Los valores de temperatura y tiempo de extracción acuosa que permiten una mayor extracción de polisacáridos fueron 81°C y 122.5 minutos con rendimiento de 105 mg de polisacáridos.

Los extractos etanólico, hidroalcohólico y los polisacáridos de *G. curtisii* presentaron capacidad de inhibición de radicales DPPH y valores de IC₅₀ bajos, lo que indica una adecuada actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólico y etanólico contribuyen a una mayor capacidad antioxidante.

11. PERSPECTIVAS

Apartir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis de maestría, las perspectivas futuras se ubican básicamente en dos direcciones. En un primer plano estarían los trabajos destinados a complementar los estudios de aislamiento y purificación de los compuestos activos identificados en el hongo *Ganoderma curtisii*. En segundo lugar realizar los ensayos biológicos de los compuestos aislados que han sido identificados con algún tipo de actividad medicinal. El campo de investigación del hongo del género *Ganoderma* es muy amplio y en México ha sido investigado poco, por lo que aún queda mucho camino por recorrer.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abul Hasnat, Mehnaz Pervin and Beong Ou Lim (2013), Acetylcholinesterase Inhibition and in Vitro and in Vivo Antioxidant Activities of *Ganoderma lucidum* Grown on Germinated Brown Rice. *Molecules*, 18, 6663-6678.
2. Adaptógenos Internacionales, (2008). Fecha de consulta: 12 de junio de 2013, URL: <http://www.adaptogeno.com/>
3. Ajith Thekkuttuparambil and Janardhanan Kainoor. (2007). Indian Medicinal Mushrooms as a Source of Antioxidant and Antitumor Agents. *J Clin Biochem Nutr.* 40(3): 157–162.
4. Al-Farsi, M. A., & Lee, C. Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, 108, 977–985.
5. Asgarpanah Jinous, Kazemivash Nastaran (2013). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 19(2):153-159.
6. Attimarad M., Mueen A., Aldhubaib B. and Harsha S. (2011). High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical drug discovery. *Pharmaceutical Methods* 2(2):71-75.
7. Avtonomova V., Krasnopolskaya L. M. and Maksimov. V. N. (2006). Optimization of Nutrient Medium for Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr.) P. Karst. *Mikrobiologiya, Vol. 75, No. 2, pp. 186–192.*
8. Bao X., Duan J., Fang X. and Fan J. (2001). Chemical modifications of the (1...>3) alpha.D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their properties and immunological activity. *Carbohydr Res.* 336:127-40.
9. Bao X., Fang J, Li X. (2001). Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65:2384-91.
10. Barros L, Dueñas M, Ferreira IC, Baptista P, Santos-Buelga C. (2009) Phenolic acids determination by HPLC-DADESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem Toxicol* 47:1076-1079.
11. Berger A., Rein D., et al. (2004). Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs, *Bio Med. Central.*
12. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev.* 13:265–301.
13. Borchers A. T, Stern J. S, Hackman R. M, Keen C. L, Gershwin M. E. (1999). Minireview: Mushrooms, tumors and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 221:281–93.
14. Borgognoni Figueiredo C., Polakiewicz Bronislaw, Pitombo Nogueira de Moraes R. (2006) *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 26(3): 502-508.
15. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.Wiss. Technol* 22, 25-30.
16. Chan W., Law H., Lin Z., Lau Y., Chan G. (2007). Response of human dendritic cells to diferent immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. *International Immunology* 19(7):891-899.
17. Chandra H. and Kant P. (2010). High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC): A Modern Analytical tool for Biological Analysis. *Nature and Science* 8(10):58-61.
18. Chang S. T, Buswell J. A. (1996). Mushroom nutraceuticals. *World J Microbiol Biotechnol.* 12:473–6.

19. Chang S. T, Buswell J. A. (1999). *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae): A mushrooming medicinal mushroom. *Int J Med Mushrooms*. 1:139–46.
20. Chang MY, Tsai GJ, Houg JY (2006) Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme Microbial Technol* 38:407-414
21. Chang S. T, Buswell J. A. (2008). Safety, quality control and regulational aspects relating to mushroom nutraceuticals. *Proc. 6th Intl. Conf. Mushroom Biology and Mushroom Products*. 188–95. GAMU GmbH, Krefeld, Germany.
22. Chen, A.W. (1999). Cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.), P. Karst (Reishi) in North America. *Int. J. Med. Mushrooms* 1 (3), 263–282.
23. Chen Y, Bicker W, Wu J, Xie M. Y, Lindner W. (2010). *Ganoderma* species discrimination by dual-mode chromatographic fingerprinting: A study on stationary phase effects in hydrophilic interaction chromatography and reduction of sample misclassification rate by additional use of reversed-phase chromatography. *J Chromatogr*. 1217(8):1255–65.
24. Chen, T. Q. Wu Y. B., Wu J. G., Wang H. Y., Mao F. H. and Wu J. Z. (2013). Fatty Acids, Essential Oils, and Squalene in the Spore Lipids of *Ganoderma lucidum* by GC-MS and GC-FID. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 49, No. 1.
25. Chethan S., Malleshi N.G. (2007) Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. *Food Chemistry* 105 (2007) 862–870
26. Cheung L. M., Cheung P. C. K., Ooi V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81: 249-255.
27. Chiu S. W, Wang Z. M, Leung T. M, Moore D. (2000). Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. *Food Chem Toxicol*. 38:173–8.
28. Chung-wah Ma, Mengying Feng et al, (2013). Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44 886-894.
29. Čilerdžić Jasmina, Vukojević Jelena, Stajić Mirjana, Stanojković Tatjana, Glamočlija Jasmina (2014). Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology* 155, 312-319.
30. Del Signore A, Romeo F, Giaccio M (1997) Content of phenolic substances in basidiomycetes. *Mycol Res* 101:552-556.
31. Draelos Zoe (2007). Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy, *Dermatologic Therapy* Vol 20, 308-313.
32. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 28(3):350-356.
33. Dumitriu Severian. (2005) Polysaccharides structural diversity and functional versatility, second edition. Marcel Dekker, New York. P.p. 1224, P. cons 395-407.
34. Durkan N, Isiloglu M, Kabar K, Dogan Y. (2008). Heavy metals levels in some macrofungi from Büyük Menderes River Basin Turkey. *Natura Montenegrina, Podgorica*, 7(2): 465-473.
35. Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. M., Foo, L. Y., et al. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officianlis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, 101, 1417–1424.

36. Evsenko M.S., Shashkov A.S., Avtonomova A. V. ,Krasnopolskaya L. M., and Usov A. I. (2009). Polysaccharides of Basidiomycetes. Alkali_Soluble Polysaccharides from the Mycelium of White Rot Fungus *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. *Biokhimiya*, Vol. 74, No. 5, pp. 657_667.
37. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaría de Salud; México, 2001. P.p. 171, p. cons. 22.
38. Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Abreu, R. M. V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543–1560.
39. Friedman M. and Jürgens H. S. (2000). Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (6), pp 2101–2110.
40. Furusawa E, Chou S. C, Furusawa S, Hirazumi A, Dang Y. (1992). Antitumour activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in synergic mice. *Phytother Res*. 6:300–4.
41. Gao J. J, Min B. S, Ahn E. M, Nakamura N, Lee H. K, Hattori M. (2002). New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chem Pharm Bull*. 50:837–40.
42. Gao Y, Zhou S, Jiang W, Huang, M., Dai, X. (2003). Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. *Immunol Invest*. 32(3):201-215.
43. Gao J., Hirakawa A., Min B., Nakamura N., Hattori M. (2006). In vivo antitumor effects of bitter principles from the antle red form of fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Medicines* 60: 42–48.
44. Gao P., Hirano T., Chen Z, Yasuhara T, Nakata Y., Sugimoto A. (2012). Isolation and identification of C 19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). *Fitoterapia* 83 (2012) 490–499.
45. Gao-Qiang Liu, Yan Zhao, Xiao-Ling Wang & Chao-Yang Zhu (2011). Response Surface Methodology for Optimization of Polysaccharides extraction by mild alkaline hydrolysis from fruiting body of medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(10) 2064-2070.
46. Gordan, J. D., Chay, W. Y., Kelley, R. K., Ko, A. H., Choo, S. P., & Venook, A. P. (2011). And what other medications are you taking? *Journal of Clinical Oncology*, 29(11), e288–e291.
47. Grimes, Pearl E. (2007). *Aesthetics and Cosmetic Surgery for Darker Skin Types*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 74.
48. Guan, S.H., J.M. Xia, M. Yang, X.M. Wang, X. Liu, D.A. Guo. (2008). Cytotoxic lanostanoids triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Asian Natural Products Research* 10(8): 695–700.
49. Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. E. (2002) Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 75: 31–49.
50. Heleno Sandrina A., Barros Lillian, Martins Anabela, João R.P. Queiroz Maria, Santos-Buelga Celestino, Ferreira Isabel C.F.R. (2012). Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International* 46, 135-140.
51. Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., Hayashi, T. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of *Ganoderma* A and B, glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica* 51, 339–340.

52. Hirotsu, M., Furuya, T. (1986). Ganoderic acid derivatives, highly oxygenated lanostanetype triterpenoids, from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 25 (5): 1189-1193.
53. Ho YW, Yeung JS, Chiu PK et al. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Mol Cell Biochem*, 301:173-9.
54. Hobbs, Ch. (1995). *Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing, and Culture*, 2nd Ed.; Botanica Press, Inc.: Santa Cruz, CA, USA.
55. Hu H., Ahn N. S., Yang X., Lee Y.S., Kang K.S. (2002). *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer* 102:250–253.
56. Huang C. Y., Chen J. Y., Wu J.E., et al. (2010). Ling-Zhi Polysaccharides potentiate cytotoxic effects of anticancer drugs against drug-resistance urothelial carcinoma cells. *J Agric Chem* 11:8798-805.
57. Huang Pu, Xie Ming-yong, Nie Shao-ping, Chen Yi, Li Chang, Xie Jiang-hua (2007). Study on Microwave-assisted Extraction of Polysaccharides from Spores of *Ganoderma atrum* with Response Surface Analysis. *Chinese Food Science* 28, 200-203.
58. HunterLab (2012), Measuring color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L*a*b*, About Hunter lab publication. AN 1005.00.
59. Imtiyaz Ahmad Sheikh, Deepak Vyas, Mohd Anis Ganaie, Keerti Dehariya, Vinita Singh. (2014). HPLC Determination of Phenolics and free radical scavenging activity of ethanolic extracts of two polypore mushrooms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences issn- 0975-1491 vol 6, suppl 1*.
60. Jeng-Leun Mau, Hsiu-Ching Lin, and Chin-Chu Chen. (2002). Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6072–6077.
61. Jia J, Zhang X, Hu Y. S, et al. (2009). Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* poly- saccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chem.* 115:32–6.
62. Jiang J, Slivova V, Harvey K, Valachovicova T, Sliva D. (2004). *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF- κ B signaling. *Nutr Cancer* 49:209–216.
63. Jiang-Jing Gao, Norio Nakamura, et al. (2004). Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using High-Performance Liquid Chromatography and its application to the evaluation of *Ganoderma* products. *Chem. Pharm. Bull.* 52(6) 688-695.
64. Jiang J., Grieb B., Thyagarajan A., and Sliva D. (2008). "Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF- κ B signaling," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 21, no. 5, pp. 577–584.
65. Jianguo Wang, Lina Zhang (2009). Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Research* 344(105-112).
66. Jing Xie, Jing Zhao, et al. (2012). Comparison of polysaccharides from two species of *Ganoderma*, *Molecules* 17, 740-752.
67. Jin-Zhe He, Qiao-Mei Ru, et al. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules* 17, 4373-4387.

68. Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 5207–5213.
69. Kamiyama Masumi, Horiuchi Masahiro, Umano Katsumi, Kondo Kazuo, Shibamoto Takayuki. (2013). Antioxidant/anti-inflammatory activities and chemical composition of extracts from the mushroom *Trametes versicolor*. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 2(2): 85-91.
70. Kang, H., Lee, H., Hwang, S., Park, W. (2002). Effects of high concentrations of plant oils and fatty acids for mycelial growth and pinhead formation of *Hericum erinaceum*. *Trans. ASAE* 45: 257–260.
71. Ker, Y. B., Chen, K. C., Chyau, C. C., Chen, C. C., Guo, J. H., Hsien, C. L., Wang, H. E., Peng, C. C., Chang, C.H., Peng, R.P., (2005). Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* Mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7052–7058.
72. Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., et al. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7265–7270.
73. Kim, Shin Duk. (2010). Isolation and Structure Determination of a Cholesterol Esterase Inhibitor from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(11), 1521–1523.
74. Kirk R. S., Sawyer R. y Egan H., 2008; *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*, Segunda edición. Grupo Editorial Patria. 777 páginas.
75. Ko H. H., Hung C.F., Wang J.P., et al. (2008). Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G tsugae*. *Phytochemistry*, 69:234-9.
76. Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., & Griensven, L. J. L. D. V. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129, 1667–1675.
77. Kozarski M., Klaus A., Niksic M., Vrvic M., Todorovic N., Jakovljevic D., Van Griensven L. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 144-153.
78. Kuo M. C, Weng C. Y, Ha C. L, Wu M. J. (2006). *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF-kappaB. *J Ethnopharmacol.* 103:217–22.
79. Lai T., Gao Y., Zhou S. (2004). Global Marketing of Medicinal Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) Products and Safety Concerns. *Int. J. Medic. Mushrooms*.
80. Lee S., Park S., Oh J. W., Yang, C. H. (1998). Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta Medica* 64: 303–308.
81. Li E. K., Tam L. S., Wong C. K. et al. (2007). Safety and efficacy of *Ganoderma Lucidum* (lingzhi) and San Miao San supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a doubled-blind randomized, placebo-controlled pilot trial. *Arthritis Rheum.* 57:1143-50.

82. Li Y., Yang Y., Fang L., Zhang Z., Jin J., Zhang K. (2006). Anti-hepatitis activities in the broth of *Ganoderma lucidum* supplemented with a Chinese herbal medicine. *Am. J. Chin. Med.* 34(2):341-9.
83. Li Y.Q. Wang S.F. (2006). Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol. Lett.* 28(11):837-41.
84. Lin C. C., Yu Y. L., Shih C. C. et al. (2011). A novel adjuvant Ling-Zhi-8 enhances the efficacy of DNA cancer vaccine by activating dendritic cells. *Cancer Immunol Immunotherapy* 60:1019-27.
85. Lin, J. -M., Lin, C. -C., Chen, M. -F., Ujiie, T., & Takada, A. (1995). Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 47, 33–41.
86. Lin S.B., Li C.H., Lee S.S., Kan L.S. (2003). Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sci* 72:2381–2390.
87. Lin W. H., Hung C. H., Hsu C. I., Lin J. Y. (1997). Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 272: 20044–20048
88. Lin, Z.B. (2005). Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *J. Pharmacol. Sci.* 99, 144–153.
89. Lindequist U, Niedermeyer T. H, Jülich W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2:285–99.
90. Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., & Gao X. (2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 51–457.
91. Liuping Fan, Jinwei Li, Kequan Deng, Lianzhong Ai. (2012). Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers* 87, 1849-1854.
92. Liyan Zhao, Yanhong Dong, et al. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate polymers* 80(783-789).
93. Lv G. P., Zhao J., Duan J., Tang Y. and Li S. (2012). Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chemistry Central Journal*, 6:10.
94. Mau J. L., Lin H. C., Chen C. C. (2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International.* 34(6):521-526.
95. Mau, J. L., Lin, H. C., & Chen C. C. (2002). Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(21), 6072–6077.
96. Mau JL, Tsai S-Y, Tseng Y-H, Huang S-J (2005) Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae*. *Murrill. LWT* 38:589-597.
97. McKenna D.J, Jones K., Hughes K. (2002). *Reishi Botanical Medicines. The Desk reference for Major Herbal Supplements*, 2nd Ed.; The Haworth Herbal Press: New York, London, Oxford, 825- 855.
98. Mendoza Pérez J.A. and Fregoso Aguilar T. A. (2013) *Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico*, Agricultural and Biological

- Sciences "Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases, A Role for Antioxidants" ISBN 978-953-51-1123-8.
99. Min B. S, Gao J. J, Nakamura N, Hattori M. (2000). Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. *Chem Pharm Bull.* 48:1026–33
 100. Min Shi, Zhenya Zhang, Yingnan Yang (2013). Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP) *Carbohydrate Polymers* 95, 200-206.
 101. Min Shi, Yingnan Yang, Xuansheng Hu, Zhenya Zhang. (2014). Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue, *Food Chemistry* 155 50-56.
 102. Miyazaki T, Nishijima M. (1981). Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull.* 29:3611–16.
 103. Mizuno T, Wang G, Zhang J, Kawagishi H, Nishitoba T, Reishi LJ. (1995). *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International* 11(1):151-166.
 104. Mizuno, T. (1997). Studies on bioactive substances and medicinal effect of Reishi, *Ganoderma lucidum*. Pp. 121-127. In: *Proceedings 1st International Symposium Ganoderma lucidum in Japan* (ed. A. committee), Toyo-Igaku-sha Co., Ltd, Tokyo, Japan.
 105. Mizuno T. (1999). The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). *Int. J. Med. Mush.* 1:9-29.
 106. Mizushina Y. L., Yamaguchi T., Takemura M., Sugawara F., Saneyoshi M. (1998). A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases. *Biochem Biophys Res Commun* 249:17–22.
 107. Montgomery D.C. (2005). *Design and analysis of experiments: Response surface method and designs*. New Jersey: John Wiley and sons, Inc.
 108. Nagaraj K, N Mallikarjun, Raja Naika, Venugopal TM. (2014). Antioxidative Activities of Wild Macro fungi *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol. 7, Suppl 2, 166-171.
 109. Noorlidah Abdullah, Siti Marjiana Ismail, Norhaniza Aminudin, Adawiyah Suriza Shuib, and Beng Fye Lau. (2012). Evaluation of Selected Culinary-Medicinal Mushrooms for Antioxidant and ACE Inhibitory Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2012, Article ID 464238, 12 pages.
 110. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). (2005). 18th edition, method 962.09 Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food, Maryland USA.
 111. Olarewaju M. Oluba, et al. (2012). Modulation of Lipoprotein Cholesterol Levels in Plasmodium berghei Malarial Infection by Crude Aqueous Extract of *Ganoderma lucidum*, Hindawi Publishing Corporation Cholesterol. Volume 2012, Article ID 536396, 6 pages.
 112. Papinutti L., (2009). Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource Technology* 101 (2010) 1941–1946.
 113. Paterson R.R.M. (2006). *Ganoderma*-A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67:1985-2001.

114. Qian Yang, Si Wang, et al. (2010). HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *International Journal of Biological Macromolecules* 46(167-172).
115. Reich E., Schibli A. (2005) Stationary Phases for Planar Separations- Plates for Modern TLC. 23:58-69.
116. Riu, H., G. Roing and J. Sancho. (1997). Production of carpophores of *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum* grown on cork residues. *Microbiologia SEM* 13: 97-103.
117. Ruhan Askin, Mitsuru Sasaki, and Motonobu Goto. (2008). Extraction of bioactive compounds from *Ganoderma lucidum*. Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto University.
118. Russell R. & Paterson M. (2006). *Ganoderma*, a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67, 1985-2001.
119. Saltarelli R., Ceccaroli P., Lotti M., et al. (2009). Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry* 116:143-151.
120. Sanodiya B. S, Thakur G. S, Baghel R. K, Prasad G. B, Bisen P. S. (2009). *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol.* 10(8):717-42.
121. Seto, S.W.; Lam, T.Y.; Tam, H.L.; et al. (2009). Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extractin obese/diabetic (+db/+db) mice. *Phytomedicine* 16, 426-436.
122. Shao B.M., Dai H., Xu W., Lin Z. B., Gao X. M. (2004). Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 323: 133-141.
123. Sheng-Quan Huang, Jin-Wei Li, et al. (2010). Optimization of Alkaline Extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their effect on immune function in mice. *Molecules* 15, 3694-3708.
124. Sheng-Quan Huang, Zheng-xiang Ning. (2010). Extraction of polysaccharide from *G. lucidum* and its immune enhancement activity, *International Journal of Biological Macromolecules*.
125. Shi J., Yu J., Pohorly J., Young C., Bryan M., & Wu Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food Agriculture and Environment*, 1, 42-47.
126. Shi L., Ren A., Mu D. and Zhao M. (2010). Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 88, Issue 6, pp 1243-1251.
127. Shimadzu Corporation. (2009) UV Talk Letter, Vol. 2 February.
128. Shiyu Tan, Qiliang Xu, Ziping Luo, Zilin Liu, Haiyan Yang, Lingli Yang. (2011). Inquiry of Water-soluble Polysaccharide Extraction Conditions from Grapefruit Skin. *Engineering*, 3, 1090-1094.
129. Skalicka-Wozniak K., Szypowski J., Los R., et al. (2012). Evaluation of Polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. Strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Soc Bot Pol* 81(1):17-21.
130. Sliva D, Labarrere C, Slivova V, Sedlak M, Lloyd Jr FP, Ho N. W. Y. (2002). *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 298:603-612.
131. Slivova V, Valachovicova T, Jiang J, Sliva D. (2004). *Ganoderma lucidum* inhibits invasiveness of breast cancer cells. *J Cancer Integr Med* 2:25-30.

132. Skoog, D.A.; Leary J.J., Holler F. James; Principios de análisis instrumental, 5° ed.; Ed. McGraw-Hill (1998), págs. 353-367.
133. Sone Y, Okuda R, Wada N, Kishida E, Misaki A. (1985). Structure and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49(9):2641-2653.
134. Stamets Paul. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms* Third edition, Ten Speed Press, 614 páginas.
135. Su C. H., Yang Y. Z., Ho H. O., Hu C. H., Sheu M. T. (2001). High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *J Chromatogr Sci.* 39(3):93-100.
136. Tang W, Liu J. W, Zhao W. M, Wei D. Z, Zhong J. J. (2006). Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sci.* 80:205–11.
137. Tello Salgado I. (2010). Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional *Ganoderma* (fungi, Ganodermataceae), conocido como Reishi en los mercados internacionales, y su relevancia para el desarrollo regional, Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias, Instituto de enseñanza e Investigación para el desarrollo agrícola regional. Puebla, Puebla.
138. Teng B. S., Wang C. D., Zhang D et al. (2012). Hypoglycemic effect and mechanism of a proteoglycan from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol, Sci*16:166-75. 21:39-47.
139. Ti-Qiang Chen, Yan-Bin Wu, Jian-Guo Wu, Lu Ma, Zhi-Hai Dong, Jin-Zhong Wu. (2014). Efficient extraction technology of antioxidant crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), ultrasonic-circulating extraction integrating with superfine-pulverization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 4557-62.
140. Torres-Torres M. G., Guzmán-Dávalos L. (2005). Notas sobre la variación morfológica de *Ganoderma curtisii* (Ganodermatales, Ganodermataceae) en México. *Revista Mexicana de Micología*, 21:39-47.
141. Trigos A., Suárez M. J. (2011). Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología* 34:63-83.
142. Ulrike Grienke, Judit Mihály-Bison, et al. (2011). Pharmacophore-based discovery of FXR-agonists. Part II: Identification of bioactive triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Biorganic and Medicinal Chemistry* 19(6779-6791).
143. Upton R. (2000). *American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium: Reishi Mushroom, Ganoderma lucidum*. Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. U.S.A. Canada: Santa Cruz.
144. Villares A., Mateo-Vivaracho L., Guillamón E. (2012). Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture* 2:452-471.
145. Wachtel-Galor S, Buswell J. A, Tomlinson B, Benzie I. F. F. (2004). Lingzhi polyphorous fungus. In: *Herbal and Traditional Medicine: Molecular Aspects of Health*. New York: Marcel Dekker Incpp. 179–228.
146. Wachtel-Galor S., Szeto Y. T., Tomlinson B., Benzie, I. F. (2004a). *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *Int J Food Sci Nutr.* 55 (1):75-83.

147. Wachtel-Galor S., Tomlinson B., Benzie I. F. (2004b). *Ganoderma lucidum* ("Lingzhi"), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *Br J Nutr.* 91 (2):263-269.
148. Wagner R., Alexander Mitchell D., Lanzi Sasaki G., Lopes de Almeida M. A. and Berovic Marin. (2003). Current Techniques for the Cultivation of *Ganoderma lucidum* for the Production of Biomass, Ganoderic Acid and Polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (4) 371–382.
149. Wagner H., Bauer R., Melchart D., Xiao PG., Staudinger A. (2011). *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines*, Second edition. Springer Wien New York.
150. Wagner H., Bladt S. (1996). *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second Edition. Springer
151. Wang S. Y., Hsu M. L., Hsu H. C., Lee S. S., Shiao M. S., Ho C. K. (1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer* 70:699–705.
152. Wasser S. P., Weis A. L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms. *Int J Medicinal Mushrooms* 1:31–62.
153. Wasser S. P, Coates P, Blackman M, Cragg G, Levine M, Moss J, White J. (2005). *Encyclopedia of Dietary Supplements*. New York: Marcel Dekker; Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*); pp. 680–90.
154. Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.* 19: 65–96. Chen, 1999;
155. Wei Liu, Hengyu Wang, et al. (2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 46(451-457).
156. Weng Y, Lu J, Xiang L et al. (2011). Ganodermasides C and D, two new Anti-aging ergosterol from spores of the medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75:800-803
157. Xie J., Zhao J., Hu D. J., Duan J. A., Tang Y. and Li S. P. (2012). Comparison of Polysaccharides from Two Species of *Ganoderma*. *Molecules* 17, 740-752.
158. Xingyi Zhu, Xiu Chen, Jie Xie, Ping Wang & Weike Su., (2012). Mechanochemical-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* spores *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 927–932.
159. Xu, J.W., W. Zhao, J. J. Zhong. (2010). Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiology & Biotechnology* 87:457–466.
160. Yang Min, Wang Xiaoming, Guan Shuhong and Xia Jiameng. (2007) Analysis of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 18, 927–939.
161. Ying Qi, Lingling Zhao and Hao H. Sun (2012). Development of a rapid and confirmatory method to identify ganoderic acids in *Ganoderma* mushrooms. *Frontiers in Pharmacology, Ethnopharmacology* Vol. 3, Article 85.
162. Yi-Wei Chag and Ting-Jang Lu. (2004). Molecular Characterization of Polysaccharides in Hot-Water Extracts of *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 12, No. 1, Pages 59-67.

163. Yu-Hsiu Tseng, Joan-Hwa Yang, Jeng-Leun Mau (2008). Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 107 732–738.
164. Yue Q. X, Xie F. B, Guan S. H., et al. (2008). Interaction of *Ganoderma* triterpenes with doxorubicin and proteomic characterization of the possible molecular targets of *Ganoderma* triterpenes. *Cancer Sci.*; 99:1461–70.
165. Yuen J. W, Gohel M. D. (2005). Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence. *Nutr Cancer*. 53:11–7.
166. Zhao J. D, Zhang X. Q. (1994). Importance, distribution and taxonomy of *Ganodermataceae* in China. *Proceedings of Contributed Symposium, B 5th International Mycological Congress, Vancouver*. August 14-21.
167. Zhao Liyan, Yanhong Dong, et al. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate polymers* 80(783-789).
168. Zhou X, Lin J, Yin Y, Zhao J, Sun X, Tang K. (2007). *Ganodermataceae*: Natural products and their related pharmacological functions. *Am J Chin Med*. 35:559–574.
169. Zhou X. W., Su K. Q., Zhang Y. M. (2012). Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(3):941-963.

<http://www.adaptogeno.com/beta/maitake.html>