



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



TESIS

**“EVALUACIÓN FITOQUÍMICA DE DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS *Ganoderma spp.*, *Trametes versicolor* Y *Schizophyllum commune* LOCALIZADAS EN EL ESTADO DE JALISCO”**

QUE PRESENTA:

**JESÚS ALEJANDRO PÉREZ ACOSTA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. IRMA GUADALUPE LÓPEZ MURAIRA**

---

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

---

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. FEBRERO, 2022.

## **Agradecimientos.**

A Dios, por darme salud y rodearme de personas generosas a lo largo de mi vida.

A mis Padres, Candelario Pérez Hernández y María T. Acosta Ruiz, mis hermanos Carlos Pérez Acosta y Daniela Pérez Acosta, por el apoyo incondicional y emocional así como siempre creer en mis aspiraciones.

Dra. Irma G. López Muraira y Dr. Héctor Flores Martínez por su apoyo en todo sentido, los conocimientos y experiencias compartidas. Son parte de mi crecimiento profesional pero sobre todo, mi crecimiento personal.

Mis revisores, M.C. Carolina L. Campos y Dr. Juan Florencio G. Leyva por todo el conocimiento compartido en laboratorio y clases, son parte de mi crecimiento profesional y personal.

Compañeros de maestría y amigo MC. Rubén Iruegas Buentello, por su amistad.

Gracias a Alina Zurita por su amistad, apoyo, cariño y ser parte importante de mi crecimiento personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por hacerme becario durante el curso de la maestría.

Al TecNM, por darme la oportunidad dentro del programa 1000 Jóvenes en la Ciencia.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. ANTECEDENTES .....	11
2.1. Generalidades de metabolitos fitoquímicos de interés terapéutico. ....	11
2.1.2. Polisacáridos ( $\beta$ -glucanos).....	17
2.1.1. Antioxidantes y método DPPH.....	20
2.2. Generalidades de estudios fitoquímicos.....	23
2.3. Importancia de la descripción taxonómica de hongos.....	24
2.4. Generalidades de los hongos medicinales.....	27
2.4.1. <i>Trametes versicolor</i> y propiedades terapéuticas asociadas.....	28
2.4.2. <i>Schizophyllum commune</i> y propiedades terapéuticas asociadas.....	29
2.4.3. Género <i>Ganoderma</i> y propiedades terapéuticas asociadas. ....	30
III. JUSTIFICACIÓN .....	32
IV. HIPOTESIS.....	34
V. OBJETIVOS .....	35
5.1. Objetivo general .....	35
5.2. Objetivos específicos.....	35
VI. MATERIALES Y METODOS.....	36
6.1. Colecta e identificación morfológica mediante claves taxonómicas. ....	36
6.2. Identificación de principales metabolitos mediante TLC.....	36

<b>6.3. Obtención de extractos.....</b>	<b>37</b>
<b>6.4. Placas TLC.....</b>	<b>38</b>
<b>6.4.1. Lieberman-Burchard.....</b>	<b>39</b>
<b>6.4.2. Anilsaldehído acético.....</b>	<b>39</b>
<b>6.4.3. Cloruro de antimonio (III).....</b>	<b>40</b>
<b>6.4.4. Ácido p-toluensulfónico .....</b>	<b>40</b>
<b>6.5. TLC para identificación de Glucósidos cardiotónicos.....</b>	<b>40</b>
<b>6.5.1 Reactivo de Kedde.....</b>	<b>40</b>
<b>6.6. TLC para identificación de cumarinas.....</b>	<b>41</b>
<b>6.7. TLC para determinación de Lactonas.....</b>	<b>41</b>
<b>6.7.1. Reactivo de Baljet.....</b>	<b>41</b>
<b>6.8. Pruebas de identificación por precipitación de metabolitos.....</b>	<b>42</b>
<b>6.8.1. Prueba rápida para Saponinas.....</b>	<b>42</b>
<b>6.8.2. Reacción de Kedde.....</b>	<b>42</b>
<b>6.8.3. Reacción de Shinoda.....</b>	<b>42</b>
<b>6.8.4. Ensayo de FeCl<sub>3</sub>.....</b>	<b>43</b>
<b>6.8.5. Ensayo de identificación de triterpenos y esteroides.....</b>	<b>43</b>
<b>6.9. Alcaloides .....</b>	<b>43</b>
<b>6.9.1. Reactivo Dragendorff para identificar alcaloides.....</b>	<b>44</b>
<b>6.9.2. Reactivo Mayer para identificar alcaloides.....</b>	<b>44</b>

<b>6.10. Actividad antioxidante DPPH.</b> .....	44
<b>6.11. Determinación del contenido de <math>\beta</math>-Glucanos</b> .....	45
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b> .....	49
<b>7.1. Colecta e identificación morfológica de especies.</b> .....	49
<b>7.2. Identificación taxonómica de muestras colectadas.</b> .....	50
<b>7.3. TLC para identificación de principales metabolitos.</b> .....	57
<b>7.4. TLC para identificación de Lactonas.</b> .....	73
<b>7.5. TLC para identificación de Glucósidos cardiotónicos.</b> .....	76
<b>7.6. TLC para identificación de cumarinas.</b> .....	79
<b>7.7. Pruebas de identificación por formación de grupos cromogénicos.</b> .....	79
<b>7.8. Actividad reductora del radical DPPH</b> .....	86
<b>7.9. Determinación de polisacáridos (<math>\beta</math>-glucanos)</b> .....	88
<b>VIII. CONCLUSIONES.</b> .....	90
<b>REFERENCIAS.</b> .....	93

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de las estructuras de anillos lactónicos. ....	13
<b>Figura 2.</b> Estructura base de los esteroides y ejemplos. ....	14
<b>Figura 3.</b> Ejemplo de estructuras químicas de saponinas estroidales y triterpénicas. .....	15
<b>Figura 4.</b> Estructura química base de un glucósido cardiotónico.....	15
<b>Figura 5.</b> Reacción de degradación de un $\beta$ -glucano utilizando enzimas.....	20
<b>Figura 6.</b> Reacción de reducción del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo.....	22
<b>Figura 7.</b> Descripción general de la estructura de un basidiocarpo o “cuerpo fructífero” .....	25
<b>Figura 8.</b> Extractos metanólicos de muestras colectadas.....	38
<b>Figura 9.</b> Características taxonómicas de los ejemplares de <i>T. versicolor</i> y <i>S. commune</i> .....	51
<b>Figura 10.</b> Características taxonómicas de las especies <i>G. sessile</i> colectadas. ....	53
<b>Figura 11.</b> Características taxonómicas de las especies <i>G. resinaceum</i> colectadas. .....	54
<b>Figura 12.</b> Basidiosporas vistas al microscopio .....	55
<b>Figura 13.</b> Placas TLC revelada con reactivo Lieberman-Burchard. ....	59
<b>Figura 14.</b> Placas TLC, reveladas con reactivo Anilsaldehído.....	61
<b>Figura 15.</b> Placas TLC, reveladas con cloruro de antimonio. ....	63
<b>Figura 16.</b> Placas TLC, reveladas con reactivo ácido p-toluensulfónico.....	65
<b>Figura 17. A)</b> Placa TLC con reactivo Baljet, <b>B)</b> placa TLC con reactivo Lieberman-Burchard.....	75

<b>Figura 18.</b> TLC revelada con reactivo de Cloruro de antimonio.....	78
<b>Figura 19.</b> Reacción de Keede para compuestos glucósidos.....	78
<b>Figura 20. A)</b> Prueba rápida de saponinas. <b>B)</b> Prueba de precipitación de alcaloides. ....	81
<b>Figura 21.</b> Prueba en tubo para identificación de esteroides y triterpenos .....	82
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de capacidad reductora del radical DPPH.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades terapéuticas asociadas a algunos grupos de compuestos fitoquímicos. ....	16
<b>Tabla 2.</b> Bioactividad identificada de algunos $\beta$ -glucanos extraídos de hongos basidiomicetos, levaduras y avena.....	18
<b>Tabla 3.</b> Pruebas fitoquímicas para la identificación de algunos grupos de metabolitos. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Claves para la identificación básica de especies de hongo macromicetos .....	26
<b>Tabla 5.</b> Imagen, descripción, localización y sustrato de los hongos colectados y estudiados en este trabajo. ....	49
<b>Tabla 6.</b> Ejemplares de hongos colectados para el estudio, origen y claves de identificación de las muestras. ....	56
<b>Tabla 7.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>G. resinaceum</i> / <i>Eucalyptus sp.</i> .....	67
<b>Tabla 8.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>G. resinaceum</i> / <i>Delonix regia.</i> ....	67
<b>Tabla 9.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>G. resinaceum</i> / <i>Casuarina equisetifolia</i> .....	68
<b>Tabla 10.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>G. sessile</i> / <i>Casuarina equisetifolia</i> .....	68
<b>Tabla 11.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>G. sessile</i> / <i>B. variegata</i> .....	69



<b>Tabla 12.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>G. sessile / Eucalyptus sp.</i> .....	69
<b>Tabla 13.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>G. sessile/árbol muerto</i> .....	70
<b>Tabla 14.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>Ganoderma sp.</i> .....	71
<b>Tabla 15.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>T. versicolor.</i> .....	71
<b>Tabla 16.</b> Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de <i>S. commune.</i> .....	72
<b>Tabla 17.</b> Rf y reacciones en placas TLC para los extractos comerciales de <i>T. versicolor</i> y <i>G. lucidum.</i> .....	72
<b>Tabla 18.</b> Identificación de compuestos lactónicos en TLC mediante la comparación de las reacciones de tres diferentes reactivos.....	73
<b>Tabla 19.</b> Comparación de Rf y reacción sobre placa TLC para identificación de lactonas.....	76
<b>Tabla 20.</b> Tamizaje de metabolitos contenidos en las muestras.....	80
<b>Tabla 21.</b> Resumen de metabolitos identificados en las muestras de hongos: <i>G. resinaceum, G. sessile, T. versicolor, S. commune</i> .....	84
<b>Tabla 22.</b> Porcentaje de polisacáridos por seco de muestra .....	88

## I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia se ha buscado aprovechar los beneficios a la salud que proporcionan ciertos alimentos incluidos plantas y hongos comestibles (Valverde *et al.*, 2015). En ese sentido, los hongos representan una alternativa para su uso terapéutico debido a los diversos compuestos (metabolitos) que poseen (Varghese *et al.*, 2019) los cuales pueden obtenerse tanto del cuerpo fructífero como del micelio (Suárez & Nieto, 2013) y de los que se han demostrado, tienen efectos benéficos para la salud (Bilal *et al.*, 2010). En diversas investigaciones se ha expuesto el uso de hongos como fuente potencial de sustancias o metabolitos secundarios que incluyen: alcaloides, terpenoides, esteroides, hormonas, vitaminas, polisacáridos, entre otros; (Bath *et al.*, 2005) mismos que poseen características terapéuticas y son usados en el tratamiento de diversas enfermedades (Cano y Romero 2016), estos metabolitos poseen propiedades antimicrobianas (Leyva *et al.*, 2013), DNA protectoras, actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2013), antitumorales, antivirales, protectores del sistema inmunológico (Vaz *et al.*, 2010) y del sistema neurológico (Jang *et al.*, 2019) entre otras.

Por otro lado, existen especies de hongos con potencial terapéutico que presentan gran similitud fenotípica, tal es el caso del género *Ganoderma* (Milay *et al.*, 2019); por lo que muchos de los nombres con los que se identifican algunas especies, han sido utilizados para definir especies distintas entre sí, lo que origina confusiones en la descripción taxonómica así como en los estudios de la distribución de las especies. Además, se ha confirmado en diversos trabajos, la existencia de grupos complejos de

especies que incluyen cepas relacionadas que se creían muy distintas entre sí. En el Estado de Jalisco, algunas especies con potencial terapéutico han sido reportadas (Etelvina *et al.*, 2014) (Rodríguez *et al.*, 2019), pero las mismas carecen de evaluaciones fitoquímicas sistémicas.

Por lo anterior, el presente estudio parte desde la colecta y confirmación de la presencia de los especímenes mediante la realización de los estudios taxonómicos conducentes en diversas zonas del Estado de Jalisco, así como la identificación, de metabolitos secundarios interés terapéutico de diversas especies de hongos *Ganoderma.*, *Trametes versicolor* y *Schizophyllum commune*, mediante el estudio fitoquímico, la determinación del contenido de polisacáridos, actividad antioxidante (DPPH), comparados con productos existentes en el mercado con contenido de extracto de hongos medicinales. La determinación de los metabolitos de interés terapéutico abrirá la pauta para determinar el potencial de las especies de estudio para ser utilizadas en la industria farmacéutica en general o como sustitutos de productos medicinales de importación.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. Generalidades de metabolitos fitoquímicos de interés terapéutico.**

A los metabolitos secundarios extraídos de hongos, plantas y otros organismos vegetales, se les denomina fitoquímicos. Estos compuestos les confieren cierta protección contra microorganismos, antagonistas herbívoros y/o competidores naturales, además de participar en la adaptabilidad y regular el crecimiento de los mismos (Russell *et al.*, 2007). Por otro lado, el término fitoquímico también se usa para definir aquellos compuestos químicos los cuales, a través de su estudio, se ha identificado un potencial uso terapéutico, ya que en diversas investigaciones se ha demostrado que el consumo regular de estos metabolitos otorga resistencia a enfermedades no transmisibles y crónicas como son las de origen cardiovascular y neurodegenerativas, así como la diabetes, cáncer, entre otras (Madhumita *et al.*, 2019).

Generalmente, se suele clasificar a los fitoquímicos a partir de sus estructuras químicas y, desde el punto de vista de su biosíntesis, los metabolitos secundarios pueden ser de diferentes tipos como: terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, compuestos organosulfurados, polisacáridos, tipo glucósido, entre otros; de los cuales se desprenden otros grupos según sus propiedades químicas (Bellik *et al.*, 2013).

Además de lo ya mencionado los fitoquímicos como alcaloides, glucósidos, aceites volátiles, taninos, resinas, y otros más; han sido utilizados en diversas aplicaciones

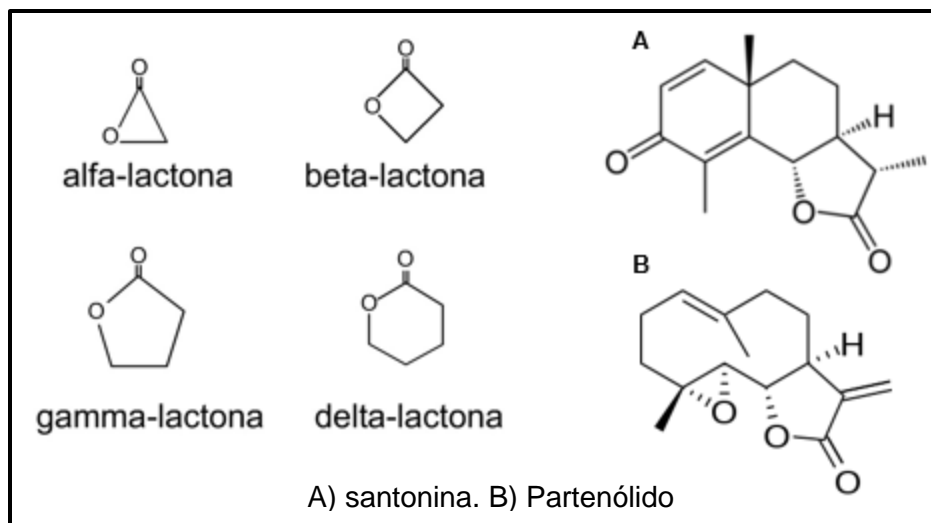
comerciales e industriales como aromas o fragancias, enzimas, conservadores y como compuestos bioactivos que forman parte de productos terapéuticos.

### **Lactonas sesquiterpénicas.**

Una lactona es un compuesto del tipo éster cíclico. Por otro lado, las lactonas sesquiterpénicas constan de un esqueleto de 15 carbonos a las que se les une un anillo  $\gamma$ -lactona tomando estructuras diversas, sin embargo la mayoría de ellas y las más funcionales tienen formas cíclicas (Chadwick *et al*, 2013).

Las propiedades terapéuticas asociadas a estos metabolitos son variadas y al ser de estructura relativamente sencilla han sido objeto de diversos estudios, en algunos de ellos se han identificado actividad antioxidante, antiinflamatoria y de potencial anticancerígeno a través de generar apoptosis en células de cáncer y como antagonista potente en varias células cancerosas, como las de mama, pulmón, hígado y colon (Martino y Sülsen, 2019) (Eduardo, 1996).

En la figura 1 se muestran las estructuras químicas características de los anillos lactónicos y ejemplos de lactonas sesquiterpénicas.

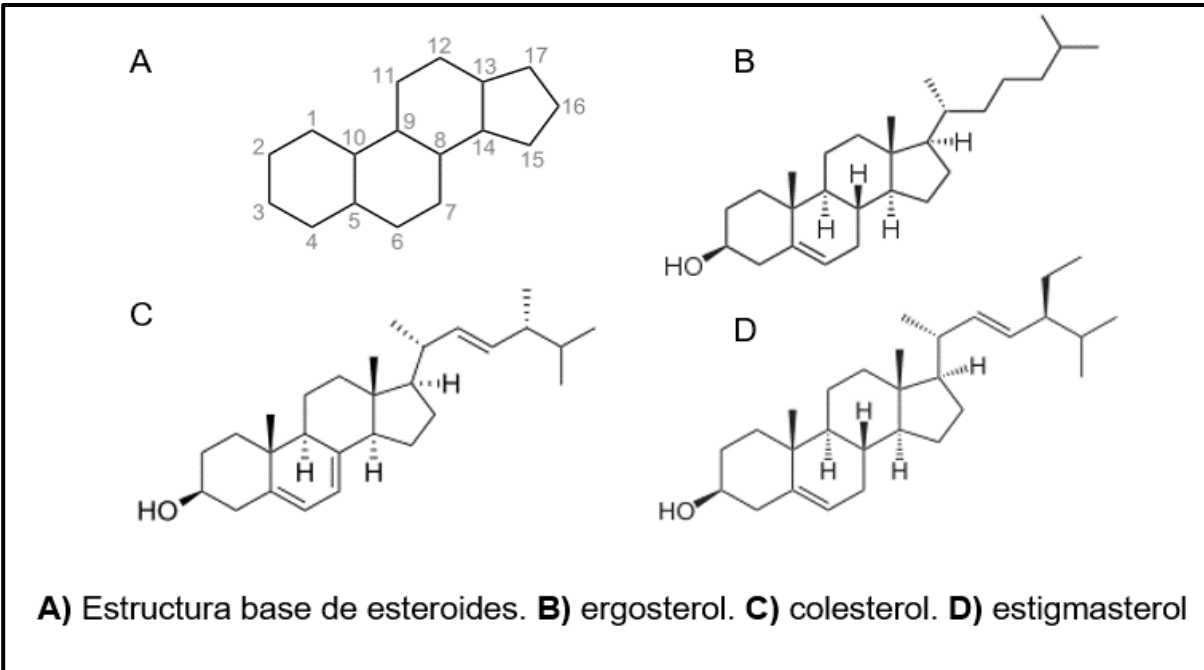


**Figura 1.** Representación de las estructuras de anillos lactonicos.

### **Esteroides.**

Los esteroides representan un gran interés debido a la variedad de actividad biológica que poseen. Muchos de estos compuestos que son utilizados en el área médica son obtenidos de plantas u organismos vegetales (Erich, 1974).

Estructuralmente, los esteroides parten de una estructura llamada esterano, conformada por tres anillos con 6 carbonos y uno de 5, siendo en total 17 átomos de carbono (Arias, 2013). En el caso de los hongos, el ergosterol cumple las mismas funciones estructurales que el colesterol en las células animales (Alfonso, 2006). La figura 2 ilustra la estructura base de los esteroides y se aprecian ejemplos de esteroides en células de plantas (estigmasterol), animales (colesterol) y hongos (ergosterol).

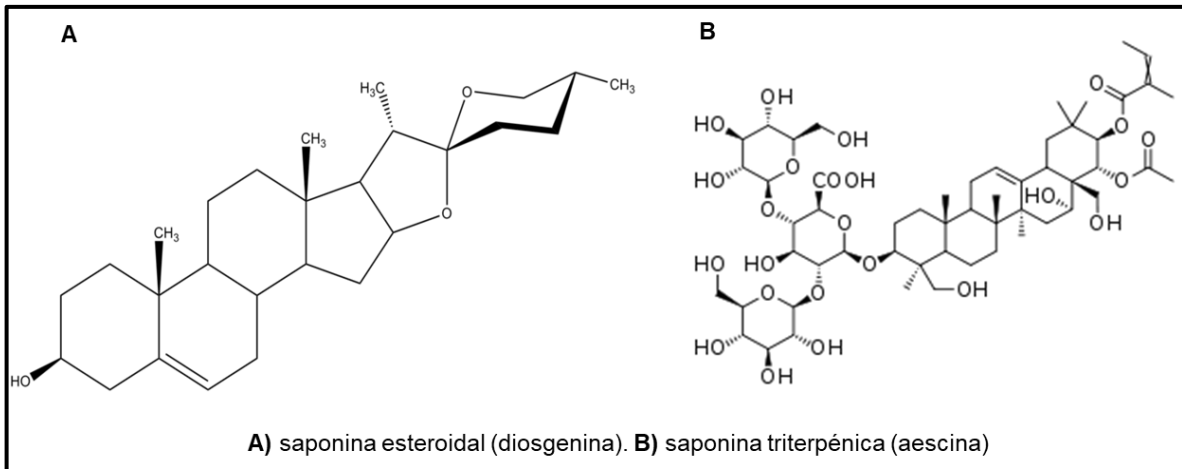


**Figura 2.** Estructura base de los esteroides y ejemplos.

### Saponinas.

Son compuestos que se encuentran en la mayoría de las plantas, al ser agitados producen espuma, por lo que antiguamente se les ha usado como jabones. Estructuralmente, estos compuestos poseen uno o varios azúcares y se pueden diferenciar entre saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales dependiendo de la naturaleza de la aglucona (Alfonso, 2006)

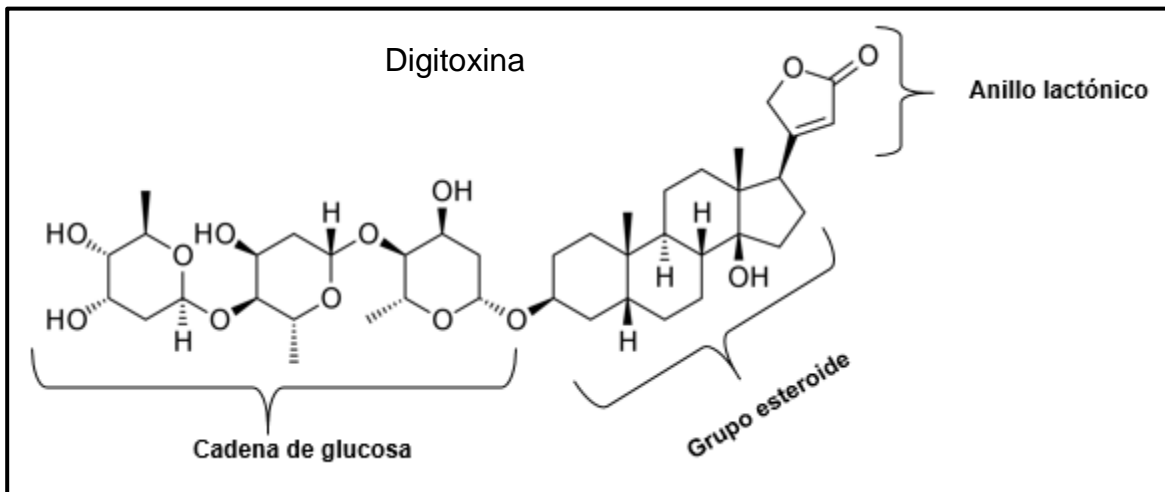
Las saponinas triterpénicas son abundantes en la naturaleza y pueden poseer actividad biológica cardíaca, reducen el colesterol, son antiinflamatorios y espermatocidas, algunas han presentado actividad citotóxica en neoplasias (Mena *et al.*, 2015). Por otro lado las saponinas esteroidales son menos frecuentes en la naturaleza pero presentan actividades biológicas similares.



**Figura 3.** Ejemplo de estructuras químicas de saponinas esteroideas y triterpénicas.

### Glucósidos cardiotónicos.

Estructuralmente estos compuestos fitoquímicos poseen un núcleo esteroidal ligado a una cadena de glucosa (Sharapin, 2000) (Heinz y Klaus, 2010) al que se le une un anillo con función lactónica (ver figura 1). La figura 4 indica la estructura química de la digitoxina, un glucósido cardíaco extraído de *Digitalis purpurea*.



**Figura 4.** Estructura química base de un glucósido cardiotónico.



Estos compuestos actúan directamente en el sistema cardiaco, en dosis controladas estos metabolitos son de gran utilidad para el tratamiento de afecciones cardiacas como el caso de arritmias y aumentando la fuerza contráctil del corazón, sin embargo, dosis elevadas en algunos casos resultan en un alto grado de toxicidad (Andrejus y Joshep, 1983).

La investigación actual de estos metabolitos de interés terapéutico está en aumento debido a la desventaja de los efectos secundarios provocados por algunos compuestos sintéticos (Paritala *et al.*, 2014). A continuación, se resumen algunos tipos de fitoquímicos y sus usos terapéuticos.

**Tabla 1.** Propiedades terapéuticas asociadas a algunos grupos de compuestos fitoquímicos.

Fitoquímico	Ejemplos/tipos	Propiedades terapéuticas asociadas
<b>Compuestos fenólicos</b>	Taninos, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos.	Poseen propiedades antioxidantes, así como pro-oxidantes que contribuyen al potencial anticancerígeno (Halliwell 2008), (Roy <i>et al.</i> , 2003), (Roy <i>et al.</i> , 2002), (Zibera <i>et al.</i> , 2010), (Ahmad <i>et al.</i> , 2000) (Galati y O'Brien, 2004), (Hadi <i>et al.</i> , 2000), (Rahman <i>et al.</i> , 1990)
<b>Flavonoides</b>	Antocianidinas, falvonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas	Antioxidantes, antiinflamatorios, reguladores enzimáticos, antimutagénicos. (Khoo <i>et al.</i> , 2017), (Iwashina, 2013)

<b>Carotenoides</b>	Xatofila (luteína, zeaxantina), carotenos (alfa carotenos, beta carotenos, licopeno)	Propiedades antioxidantes, anticancerígenas y actividad provitamina (Madhumita <i>et al.</i> , 2019).
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides heterocíclicos (piridina, quinilina, tropano, indoles, alcaloides esteroidales, entre otros)	Principalmente actividad antimicrobiana, así como estimular el sistema nervioso central (algunos usados en trastornos mentales) (Ogunwenmo <i>et al.</i> , 2007), (Njeru <i>et al.</i> , 2013)
<b>Polisacáridos</b>	Glucanos (beta glucanos, alfa glucanos)	Propiedades anticancerígenas (Madhumita <i>et al.</i> , 2019), (Hirui <i>et al.</i> , 2017)

### 2.1.2. Polisacáridos ( $\beta$ -glucanos)

Los polisacáridos son compuestos presentes en hongos, bacterias, cereales, algas y otros organismos y su función principal es formar parte estructural de los mismos, dichos compuestos se pueden clasificar a partir del tipo de uniones que presentan (Qiang *et al.*, 2017). Los  $\beta$ -glucanos se distinguen estructuralmente por ser cadenas de glucosa unidas mediante enlaces del tipo  $\beta$  (1-3) con ramificaciones que pueden ser del tipo  $\beta$  (1-4) /  $\beta$  (1-6) según su origen. Aquellas estructuras de polisacáridos que poseen enlaces del tipo  $\beta$  (1-3, 1-4) se encuentran en diversos cereales las del tipo  $\beta$  (1-3, 1-6) por lo regular están en hongos y levaduras.

Se ha demostrado que este tipo de polisacáridos poseen propiedades anticancerígenas, antitumorales y estimulan el sistema inmunológico, ciertas

investigaciones mencionan que la actividad biológica de estos compuestos está dada por la cantidad y variabilidad de los tipos de enlaces que poseen (Michael *et al.*, 2009). Es por ello que, a pesar de que estos tipos de glucanos tienen estructuras similares, pueden presentar diferentes propiedades terapéuticas (Jin *et al.*, 2018) (Han *et al.*, 2020).

La tabla 2 muestra algunos enlaces identificados de  $\beta$ -glucanos provenientes de hongos, levaduras y cereal, así la actividad biológica observada.

**Tabla 2.** Bioactividad identificada de algunos  $\beta$ -glucanos extraídos de hongos basidiomicetos, levaduras y avena.

Fuente	Estructura	Actividad biológica observada
<i>Pleurotus ostreatus</i>	(1-3)- $\beta$ -D-glucan, heteroglucanos	Aumenta la producción de linfocitos. (Andriy <i>et al.</i> , 2009).
<i>Schizophyllum commune</i>	Cadena con enlaces (1-3)- $\beta$ -D-glucan, con ramificaciones (1-6)- $\beta$ -D-glucopirano cada tres repeticiones	Promueve la expresión de citoquinas y el aumento de la actividad de las células NK ( <i>natural killer</i> ). (Yoneda <i>et al.</i> , 1991)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cadena de enlaces $\beta$ -(1-3)-glucan	Producción de proteína TNF- $\alpha$ (proteína factor de necrosis tumoral) y proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1). (Zheng <i>et al.</i> , 2016)

<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	$\beta$ -(1,3)-glucan	Aumenta la respuesta de células inmunológicas Th2. (Ying <i>et al.</i> , 2013)
<b>Avena</b>	$\beta$ -(1,3)(1,4)-glucan	Aumenta la fagocitosis sobre macrófagos. (Sado <i>et al.</i> , 2016)

En la industria de alimentos, la utilización de Kits de identificación de  $\beta$ -glucanos se ha empleado para detectar estos polisacáridos provenientes de hongos, esto debido a que es un método preciso y la mayoría de estos son adaptables a diversas muestras. Como ya se mencionó, los polisacáridos son largas cadenas de glucosa y en el caso de los  $\beta$  glucanos, poseen enlaces del tipo  $\beta$  1-3, 1-4 y 1-6, por ello el procedimiento de identificación de estos compuestos mediante un kit incluye el uso de enzimas que son específicas para los enlaces antes mencionados, el resultado de la reacción puede ser medido con un espectrofotómetro para evaluar el producto obtenido y hacer una cuantificación de los mismos.

El siguiente esquema ejemplifica la reacción de degradación de un  $\beta$ -glucano, mediante el uso de enzimas.



superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo reactivos o derivadas del nitrógeno como óxido nítrico, dióxido de nitrógeno o el trióxido de dinitrógeno.

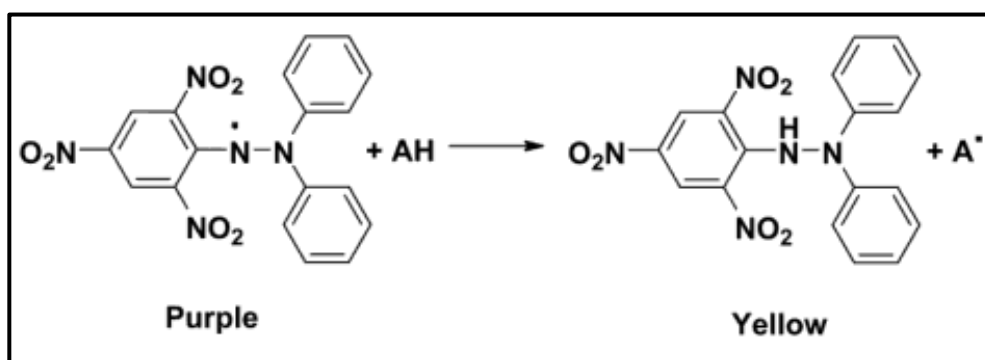
Por otro lado los antioxidantes son aquellos compuestos que, a baja concentración, tienen la capacidad de prevenir la oxidación y alargan la vida de moléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos, ADN y otras) (Sindhi *et al.*, 2013) que pueden ser dañadas por los radicales libres. (Irshad & Chaudhuri, 2002)

Las plantas y hongos son fuente de fitoquímicos con propiedad antioxidante, se ha reportado en diversos artículos esta propiedad en hongos silvestres y comestibles, en estos estudios se ha identificado la actividad a través de ensayos que incluye pruebas del radical DPPH, poder reductor, quelación férrica, la eliminación de radicales de anión superóxido y ensayos bioquímicos que incluyen la inhibición de la peroxidación lipídica.

En diversas especies de hongos comestibles como *Agaricus bisporus*, se ha identificado la presencia de compuestos fenólicos,  $\beta$ -carotenos, flavonoides y licopenos (Robaszkiewicz *et al.*, 2010), en *Boletus edulis*, la presencia de licopeno, ácido ascórbico, flavonoides, tocoferol, antocianidina (Vamanu y Nita, 2013), (Turfan *et al.*, 2018), para la especie *Lactarius deliciosus* se ha reportado compuestos como  $\alpha$ -tocoferol, compuestos fenólicos, flavonoides, fibra dietética,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (Barros *et al.*, 2007).

## Método DPPH.

Uno de los métodos más eficientes, estables y reproducibles para medir la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en alimentos (incluidos plantas y hongos comestibles), es la prueba del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), este se utiliza para evaluar la capacidad de los elementos antioxidantes de reducir el radical DPPH mediante mecanismos de donación de electrones o de hidrogeno (figura 6) (Srisailam et al, 2017). El radical tiene un máximo de absorción de 515 nm y la neutralización causada por compuestos antioxidantes es fácilmente monitorizada mediante espectroscopia UV/vis.



**Figura 6.** Reacción de reducción del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo

La presencia de un compuesto con dicha actividad antioxidante ocasiona una reducción del radical y a su vez una disminución de la absorbancia. En la reacción, la solución del radical DPPH se forma en color violeta intenso y se vuelve incoloro a amarillo pálido cuando se reduce al reaccionar con el donante de hidrógeno. La disminución de la absorbancia depende linealmente de la concentración de antioxidante (Brand-Williams et al., 1995).

A partir de los datos adquiridos durante en el ensayo, la capacidad antioxidante se mide trazando el porcentaje de inhibición frente a la concentración del antioxidante.

## **2.2. Generalidades de estudios fitoquímicos.**

Se ha mencionado acerca del interés terapéutico de los metabolitos presentes en plantas y hongos, esto ha llevado a desarrollar, a lo largo del tiempo, diversas metodologías para la identificación de los mismos con el fin de profundizar en sus propiedades farmacológicas y/o terapéuticas. Dichas metodologías se basan en reacciones químicas que pueden ser, por ejemplo, un cambio en las características visuales de la mezcla (color y precipitación) o cambios en las características físicas (como la formación de espuma).

El estudio fitoquímico agrupa entonces, una serie de pruebas, metodologías y técnicas denominadas también screening o tamiz fitoquímico, diseñadas para la identificación de metabolitos o grupos de compuestos presentes en extractos de plantas, hongos y otros organismos vegetales, que pueden ser etanólicos, metanólicos, en acetona, cloroformo, acuosos, entre otros y que son el objeto de estudio.

Entre las técnicas usadas en este tipo de investigaciones están las que representan una opción reproducible y de bajo costo como son, por ejemplo, la cromatografía en capa fina y el tamizaje fitoquímico (que incluye varias pruebas de reacción química, algunas de ellas se describen en la tabla 3), también existen metodologías más



complejas y de las cuales sus costos son mayores. Estas son requeridas cuando ya se ha establecido, a través de las pruebas anteriormente mencionadas, un grupo de metabolitos de interés farmacológico determinado, además de ello, en estas técnicas se emplean equipos especiales y de mayor tecnología, como cromatografía de líquidos HPLC, cromatografía de gases, espectrofotometría de masas, espectrofotometría de infrarrojos, entre otras (Guillermo *et al.*, 2017). La tabla 3 agrupa algunas reacciones que identifican ciertos grupos fitoquímicos presentes en extractos obtenidos de plantas y hongos (Prashant *et al.*, 2011) (Roopalatha y Vijay, 2013).

**Tabla 3.** Pruebas fitoquímicas para la identificación de algunos grupos de metabolitos.

Grupo fitoquímico o metabolito	Reacción
Alcaloides	Mayer, Dragendorff
Glucósidos	Borntrager, reactivo de Kedde
Saponinas	Formación de espuma a partir de extracto caliente
Fitoesteroles, lactonas, esteroides	Lieberman-Burchard, Salkowski
Fenoles	Cloruro férrico
Flavonoides	Hidróxido de sodio, acetato de plomo

### 2.3. Importancia de la descripción taxonómica de hongos.

Dentro de la amplia y compleja clasificación de los hongos podemos diferenciar a los macromicetos, los cuales se distinguen por llegar a producir bajo ciertas condiciones, cuerpos fructíferos o setas, dónde se incluyen los grupos ascomicetos, zigomicetos y

basidiomicetos. Los basidiomicetos albergan una gran variedad de hongos, entre ellos: comestibles, tóxicos, medicinales y degradadores de madera (Campbell y Reece 2005). Se suele denominar como “hongo” al cuerpo fructífero o, en el caso de los basidiomicetos, al basidiocarpo que es visible sobre la superficie del sustrato, esta estructura da soporte a las basidias que a su vez producen esporas para mantener la reproducción del hongo, la figura 7 ilustra la estructura general de los basidiocarpos.



**Figura 7.** Descripción general de la estructura de un basidiocarpo o “cuerpo fructífero”.

La manera más básica de identificar (de manera inicial) una especie de hongo macromiceto es el estudio de la morfología del basidiocarpo o “cuerpo fructífero”, características como la forma, el sabor y el color, en conjunto con el análisis de la morfología (su estructura en general) y las esporas del hongo mismo, pueden dar un

indicio de si el ejemplar es comestible o no, así como identificar si se trata de una especie de interés terapéutico. En los basidiomicetos las características del himeneo y del cuerpo fructífero así como de la observación de claves taxonómicas son básicas para la identificación parcial de la especie, algunas de esas claves se describen en la tabla 4 (Guzmán, 1990).

**Tabla 4.** Claves para la identificación básica de especies de hongo macromicetos

Caracteres	Observación
Forma	Amorfa, circular, crecimiento en grupos, entre otras.
Color	Color y cambios de color de cada una de las formas del cuerpo fructífero
Estructura del cuerpo fructífero	Presencia o ausencia de cualquier característica llamativa a la vista; verrugas, poros, laminas, laca o resina, pie, carnosidad, capas de poros, dureza del cuerpo fructífero.
Sensoriales	En algunos casos se puede distinguir a través del olor y el sabor, alguna característica relevante de hongos.
Esporas	La coloración del conjunto de esporas y la observación al microscopio de las mismas dan información importante de la especie estudiada.
Sustrato	La identificación del sustrato en el que el ejemplar es colectado puede dar indicios de la especie.

#### **2.4. Generalidades de los hongos medicinales.**

En diversos estudios para estos hongos, se han encontrado polisacáridos biológicamente activos en sus cuerpos fructíferos, así como en micelio cultivado (Wasser, 2010). A nivel mundial, los hongos macromicetos formadores de setas, representan una importante fuente de metabolitos para el desarrollo de alimentos, materias primas para la producción de fármacos o de otros productos de origen natural y rápidamente han comenzado a ganar interés comercial, social, económico y ecológico (Chang y Miles, 2004).

Habitualmente, los compuestos que finalmente puedan formar parte de un fármaco o producto terapéutico deberán contar con una actividad in vivo probada que puede diferir de la actividad in vitro. Estos mismos procesos deben de considerarse al momento de decidir utilizar un hongo, o los metabolitos que produce, para el tratamiento de enfermedades (Francisco-D.D., 2011).

Hongos que provienen principalmente de países asiáticos son utilizados ampliamente en el tratamiento de enfermedades entre las que destacan características propiedades anticancerígenas y protectoras del sistema cardiovascular (Nicholas, 2016) (Yifan *et al.*, 2018) efecto quimiopreventivo, regulan la tasa mitótica de señales apoptogénicas, lo que resalta el potencial farmacológico de los hongos en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Finimundy *et al.*, 2018).

#### **2.4.1. *Trametes versicolor* y propiedades terapéuticas asociadas.**

*T. versicolor* es una de las especies de hongos no comestibles que son apreciadas por su potencial terapéutico y antioxidante (Cai *et al.*, 2010). Esta especie de hongo posee metabolitos como ácidos grasos, aldehídos, esteroides (Vivian *et al.*, 2019). En 2013, Kamiyama y colaboradores demostraron la actividad antioxidante de este hongo y asociaron dicha actividad a los compuestos aromáticos y heterocíclicos, además de identificar la presencia de lactonas. Raluca y colaboradores (2018) identificaron 28 compuestos, en su mayoría ácidos fenólicos, seguidos de flavonoles, flavonas y cumarinas que le confieren la capacidad antioxidante a esta especie.

Una de las propiedades medicinales que se les adjudican a este hongo es la actividad de protección hepática. Extractos etanólicos y sub-fracciones de acetato de etilo y hexano obtenidos de cuerpos fructíferos de hongos *T. versicolor* pertenecientes al Estado de Colima en México, demostraron poseer dicha actividad al proteger células hepáticas del daño causado por radicales libres (Placido *et al.*, 2015).

Otra de las características interesantes demostradas de los compuestos bioactivos obtenidos del filtrado de cultivo de *T. versicolor* es la actividad antifúngica que posee al inhibir las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, y por *A. parasiticus*, las cuales resultan dañinos para los animales y seres humanos (Scarpari *et al.*, 2016).

Más recientemente, Milena y colaboradores en 2020, demostraron la capacidad antioxidante del extracto etanólico para *T. versicolor*, el cual tuvo mejores rendimientos en la prueba de DPPH, no así en otros ensayos como la prueba de

FRAP en dónde el extracto acuoso demostró mejor actividad reductora; esto es evidencia de la variedad de compuestos con actividad antioxidante y terapéutica presentes en esta especie en dónde los compuestos fenólicos son los de mayor poder reductor.

#### **2.4.2. *Schizophyllum commune* y propiedades terapéuticas asociadas**

Es un hongo no comestible y a pesar de ello se les considera con potencial terapéutico (Komatsu *et al.*, 1969). Se les puede localizar creciendo en troncos caídos, arboles vivos y postes de madera en zonas con insolación directa; estas setas tienen forma de láminas de color gris con pelos blancos en el borde y son degradadoras de lignina (Guzmán, 1990). Dentro de sus principales propiedades medicinales se encuentran: actividad antioxidante, antidiabética (Bugrahan *et al.*, 2017) y en investigaciones recientes, propiedad de protección hepática (Amar *et al.*, 2019).

Algunas investigaciones recientes, muestran qué los extractos obtenidos de *S. commune* han sido probados en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (Amar *et al.*, 2019) demostrando así su potencial para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Arbaayah y Kalsom en 2013, compararon la actividad antioxidante de *S. commune* contra cuatro especies de *Pleurotus spp.*, los extractos etanólicos de *S. commune* obtuvieron los valores más altos de contenido total de flavonoides en este estudio. No solo los compuestos fenólicos poseen propiedades antioxidantes, recientemente

Wongaem y colaboradores en 2020 demostraron la capacidad antioxidante de cinco péptidos extraídos de *S. commune*.

Emsen y colaboradores (2017) obtuvieron diferentes extractos de *S. commune* y compararon sus características citotóxicas y actividad antioxidante, encontrando que el extracto de acetona tenía una cantidad máxima de  $\beta$ -caroteno, fenoles y licopeno, el extracto de n-hexano tenía una cantidad máxima de flavonoide. Además, los extractos de acetona y n-hexano ejercieron importantes efectos citotóxicos in vitro contra las líneas celulares del carcinoma hepatocelular (HepG2).

#### **2.4.3. Género *Ganoderma* y propiedades terapéuticas asociadas.**

El género *Ganoderma* es ampliamente valorado por sus características terapéuticas y varias especies han sido estudiadas además de ser utilizadas en diversos productos comerciales. Una de las especies más examinadas es *G. lucidum* por sus propiedades antitumorales, antioxidantes, antimicrobianas, entre otras; adjudicadas principalmente a los metabolitos que posee, tales como triterpenos y polisacáridos (Smina *et al.*, 2011) (Wang *et al.*, 2019) (Liu *et al.*, 2010) (Meneses *et al.*, 2016), (Moreno *et al.*, 2010) (Rubel *et al.*, 2018), (Lin *et al.*, 2018) (Saltarelli *et al.*, 2009) (Lee *et al.*, 2011). Por otro lado, especies como *G. sinense* han demostrado poseer metabolitos de interés terapéutico (Mengzhu *et al.*, 2018), debido a ello, existe un interés en el estudio de otras variedades del género *Ganoderma*. En 2008, Amaral y colaboradores realizaron la extracción de polisacáridos e identificación de un inusual  $\beta$ -glucano y evaluaron su potencial antioxidante, esto a partir de una extracción alcalina del cuerpo fructífero de *G. resinaceum*.

De igual forma Peng y colaboradores en 2013, observaron los efectos protectores y de capacidad antioxidante del extracto metanólico con contenido de triterpenoides en *G. resinaceum*. Gokhan y colaboradores, en 2015, evaluaron extractos acuosos y metanólicos de dos especies, *G. applanatum* y *G. resinaceum* encontrando principalmente ácido protocatechico y apigenina como principales metabolitos antioxidantes, esto en extractos metanólicos y acuosos.

Uno de los usos emergentes de algunas especies del género *Ganoderma* tiene que ver con la transformación de compuestos, Hou y colaboradores (2020) estudiaron la capacidad que posee *G. sessile* para la biotransformación del 5-hidroximetilfurfural en 2,5-dihidroximetilfurano y evaluaron la toxicidad de dichos compuestos.

La información mostrada sobre las diversas propiedades terapéuticas que pueden presentar los compuestos fitoquímicos contenidos en hongos, hace relevante estudiar las especies presentes en la región para definir las características de potencial uso terapéutico a futuro.



### III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad hay una creciente demanda de productos de origen natural, entre ellos, los llamados nutraceuticos o productos funcionales. En el mercado mundial existe una gran variedad de estos productos a partir de hongos comestibles y no comestibles, con propiedades medicinales o terapéuticas. Por otro lado, en el Estado de Jalisco, específicamente en las regiones boscosas y neotropicales de la región, existe una gran diversidad de especies de hongos productores de setas, entre los que se encuentran aquellas especies a las cuales se les ha adjudicado algún beneficio a la salud humana o propiedad terapéutica. Debido al interés de hacer uso de especies endémicas para la obtención de productos terapéuticos en el tratamiento de algunas enfermedades, es necesario realizar análisis enfocados a determinar las características químicas y las propiedades terapéuticas de los hongos estudiados.

Existe amplia investigación respecto a las propiedades terapéuticas de las especies de género *Ganoderma*, *T. versicolor*, *S. commune*, sin embargo es importante llevar a cabo los análisis que permitan verificar la presencia o ausencia de los principales metabolitos que en diversas investigaciones se reportan, así como analizar las diferencias que pudieran existir debido diversos factores como los factores ambientales y tipos de sustrato propios de la región, mismos que pueden modificar la presencia y concentración de dichos compuestos (Oliveros, 2016).

En el Estado de Jalisco se ha reportado la presencia de algunas especies de *Ganoderma*, así como *T. versicolor* y *S. commune*, mismas que no han sido objeto de estudios formales, por lo cual es necesario realizar análisis enfocados a determinar

las características fitoquímicas, antioxidantes de sus principales metabolitos con potencial uso en la industria farmacéutica o en el mercado de productos naturales.

#### **IV. HIPOTESIS**

Los extractos obtenidos a partir de los hongos del género *Ganoderma spp.*, *Trametes versicolor* y *Schizophyllum commune* localizados en el Estado de Jalisco poseen metabolitos de interés terapéutico y de características fitoquímicas y antioxidantes que podrían permitir la sustitución de productos de importación en el mercado.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Identificar los principales grupos fitoquímicos presentes en especies de *Ganoderma spp.*, *T. versicolor* y *S. commune* localizadas en zonas del Estado de Jalisco, en comparativa con productos similares de importación existentes en el mercado.

### **5.2. Objetivos específicos**

5.2.1. Realizar la identificación morfológica de los diferentes ejemplares de hongos *Ganoderma spp.*, *Trametes versicolor* y *Schizophyllum commune* colectados en diversas zonas de los municipio de Tlajomulco de Zuñiga, Zapopan, Tapalpa y Mezcala en Estado de Jalisco.

5.2.2. Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los diferentes ejemplares de hongos *Ganoderma spp.*, *Trametes versicolor* y *Schizophyllum commune* colectadas en diversas zonas de los municipio de Tlajomulco de Zuñiga, Zapopan, Tapalpa y Mezcala en Estado de Jalisco, comparados con productos de importación en el mercado nacional.

5.2.3. Evaluar la actividad antioxidante (DPPH) y el contenido de polisacáridos ( $\beta$ -glucanos) de los diferentes ejemplares de hongos *Ganoderma spp.*, *Trametes versicolor* y *Schizophyllum commune* colectadas en diversas zonas de los municipio de Tlajomulco de Zuñiga, Zapopan, Tapalpa y Mezcala en Estado de Jalisco, en comparativa con productos de importación en el mercado.

## **VI. MATERIALES Y METODOS.**

### **6.1. Colecta e identificación morfológica mediante claves taxonómicas.**

La colecta de las especies de estudio se llevó a cabo en diversas zonas del Estado de Jalisco, en los municipios de Tlajomulco, Zapopan, Tapalpa y Mezcala. Las especies del género *Ganoderma* fueron localizadas en distintas especies de árboles. Una vez recogida la muestra se realizó una identificación morfológica de las especies mediante las claves de Gastón (1990).

Las características valoradas para dicha descripción e identificación de los ejemplares colectados incluyen el tamaño y color del cuerpo fructífero, tamaño y color de los poros o laminas, la presencia o ausencia de laca o resinas, la presencia o ausencia de un pie o falso pie, el sustrato en el que se localizó la muestra así como la observación de las esporas al microscopio.

### **6.2. Identificación de principales metabolitos mediante TLC.**

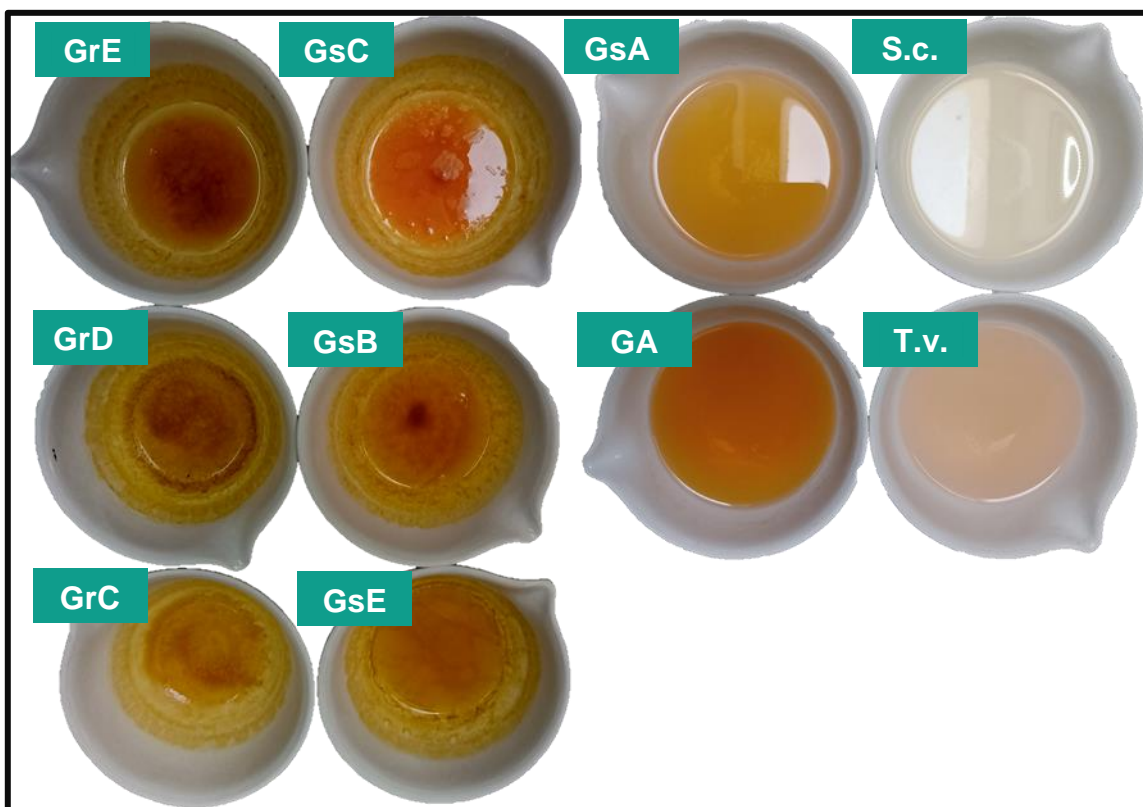
La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica cualitativa para la identificación de compuestos químicos mediante la visualización de éstos a partir de la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla o en estado puro. La técnica consiste en una fase estacionaria (por ejemplo, una placa de sílica gel) y una fase móvil (disolvente), la fase móvil pasa a través de la placa arrastrando los diferentes compuestos aplicados sobre ella, separándolos por efecto de la polaridad (afinidad al solvente) que poseen los mismos.

Se realizaron pruebas de Cromatografía en Capa Fina (TLC) para identificar los principales grupos de metabolitos, para ello se prepararon extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos de *G. sessile*, *G. resinaceum*, *T. versicolor*, *S. commune*, de la siguiente manera:

### **6.3. Obtención de extractos.**

Los ejemplares frescos de hongos fueron limpiadas cuidadosamente y pesadas en fresco, posteriormente se picaron finamente y se llevaron a un secador con temperatura no mayor a 40°C durante toda la noche o hasta que se encontraran completamente secos (<10%), una vez terminado el secado, se molieron para preparar los extractos (partículas no mayor a 5 mm).

Se tomaron 5 gramos de muestra seca y reducida, se realizó la extracción en 100 ml de metanol, todos los extractos se dejaron reposar durante toda la noche, a temperatura ambiente, finalmente fueron tratadas en un sonicador (UltraSonic Cleaner) durante 30 min a 60 Hz. El extracto fue filtrado y se dejó secar en cápsulas de porcelana para su resguardo y posterior aplicación (figura 8).



**Figura 8.** Extractos metanólicos de muestras colectadas.

#### **6.4. Placas TLC.**

Se utilizaron placas de aluminio TLC Sílica Gel 60 F254 (Merck KGaA). 0.05 g de extracto seco fueron re-suspendidos en 2 ml de cloroformo. El extracto re-suspendido se aplicó por puntos a razón de 0.5  $\mu\text{L}$ /punto hasta aplicar 20  $\mu\text{L}$ , la fase utilizada fue tolueno (10 ml), éter etílico (9 ml), ácido acético (1 ml).

Todas las placas de cromatografía en capa fina se analizaron a partir del cálculo de los R<sub>f</sub>, que es la relación entre las distancias recorridas por el soluto y por la fase desde el origen de la placa, así como con la reacción de coloración resultante de aplicar los reactivos de revelación de placa.

Los métodos para la preparación de reactivos así como de las pruebas de identificación mediante la formación de grupos cromogénicos fueron tomados de trabajos de autores que presentan pruebas fitoquímicas de plantas y hongos (Ciria 1995), (Domínguez 1973), (Wagner *et al*, 1984).

Las placas fueron asperjadas para la identificación de los diferentes metabolitos, con los siguientes reactivos:

#### **6.4.1. Lieberman-Burchard.**

5 ml de Anhídrido acético fueron mezclados en 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y agregados a 50 ml de etanol frío, se prepararon 20 ml de la solución. El reactivo fue asperjado en la placa y una vez seca se calentó a 110 °C y observada en luz UV (365 nm). Coloraciones moradas indican triterpenos; verdes y azules para esteroides; café y marrón indican la presencia de lactonas; amarillos, compuestos amargos; rosa, puede indicar presencia de saponinas.

#### **6.4.2. Anilsaldehído acético.**

El reactivo se preparó tomando 0.5 ml de anilsaldehído, que fueron disueltos en una solución que consistía en metanol (85 ml), ácido acético (10 ml) y ácido sulfúrico (5 ml). Una vez asperjado el reactivo la placa se calentó a 100°C. El reactivo interacciona con una gran variedad de compuestos incluyendo indicación amarilla (lactonas), verdes y morados (compuestos esteroides).



#### **6.4.3. Cloruro de antimonio (III)**

20 ml de ácido acético fueron mezclados con 60 ml de cloroformo y agregados a 20 g de cloruro de antimonio, la placa se asperjó y se calentó por 5 min a 100°C, coloraciones amarillas a rojizas representan presencia de esteroides, azul-violeta triterpenos.

#### **6.4.4. Ácido p-toluensulfónico**

4 g de reactivo ácido p-toluensulfónico fueron disueltos en 20 ml de cloroformo, una vez asperjada la placa se visualizó bajo luz UV a 365 nm, observaciones fluorescentes indican compuestos esteroides, flavonoides y catequinas.

#### **6.5. TLC para identificación de Glucósidos cardiotónicos.**

0.05 g del extracto metanólico fueron re-suspendidos en una mezcla de metanol y agua (70:30) y se aplicaron en placas TLC para su análisis. La fase utilizada para esta prueba en placa TLC fue acetato de etilo, metanol y agua (16.2 ml, 2.2. ml, 1.6 ml), una vez que se corrió la fase la placa fue revelada con el siguiente reactivo:

##### **6.5.1 Reactivo de Kedde.**

1 g de ácido 3,5 – dinitrobenzoico fue disuelto en una mezcla de 50 ml de metanol y 50 ml de una solución de KOH 2N. La placa se asperjó y se evaluaron a simple vista la aparición de manchas violetas-azules las cuales indican positivo para glucósidos cardiotónicos.

### **6.6. TLC para identificación de cumarinas.**

0.05 g de extracto metanólico fueron disueltos en 2 ml de cloroformo. Las placas TLC para identificación de cumarinas se corrieron en una fase que consistió en tolueno y acetato de etilo, en una relación de 100:20. Una vez terminada la corrida de la fase, la placa se asperjó con una solución de KOH a 7% en etanol, fluorescencias azules indican presencia de cumarinas.

### **6.7. TLC para determinación de Lactonas.**

0.05 g de extracto metanólico fueron disueltos en 2 ml de metanol. Las placas TLC para la prueba de lactonas se corrieron en una fase que consistía en tolueno (5ml), éter etílico (4.5ml), ácido acético (0.5ml). Una vez terminada la fase la placa fue revelada con el reactivo siguiente:

#### **6.7.1. Reactivo de Baljet.**

Solución A: 0.13 g de ácido pícrico se agregan a 10 ml de etanol; solución B: 1 g de NaOH se disuelven en 10 ml de agua, ambas soluciones se mezclan y se asperjan en la placa seca, la presencia de manchas color marrón indican la presencia de Lactonas.

## **6.8. Pruebas de identificación por precipitación de metabolitos.**

Se llevaron a cabo pruebas de presencia de metabolitos presentes (Saponinas, reacción de Kedde, reacción de Shinoda, ensayo de FeCl<sub>3</sub>, Alcaloides, ensayo de triterpenos y esteroides), como se describe a continuación.

### **6.8.1. Prueba rápida para Saponinas.**

1 g de muestra seca fue extraída en dos volúmenes de agua caliente, el extracto acuoso filtrado se dejó enfriar y se transfirió a tubos en ensayo, se agitó vigorosamente durante un minuto y se observó la formación de espuma, así como la firmeza y duración de la misma.

### **6.8.2. Reacción de Kedde.**

A una solución de ácido-3,5 Dinitrobenzoico al 3% en etanol se le agrega una solución de NaOH 2 M en etanol. El reactivo se agrega a 1 ml de extracto metanólico, la aparición de colores de rosa-violeta-rojizos se considera positivo para la presencia de glucósidos cardiotónicos (cardenólidos).

### **6.8.3. Reacción de Shinoda.**

A 2 ml de extracto metanólico en tubo se le agrega una gota de HCl, al agregar una tira de magnesio la prueba se considera positiva flavonoides, si el extracto vira a colores rojizos-violeta.

#### **6.8.4. Ensayo de FeCl<sub>3</sub>.**

La prueba determina la presencia de compuestos con hidroxilos fenólicos. 0.05 g de extracto metanólico fueron re suspendidos en cápsulas de porcelana con etanol, el lavado fue trasferido a un tubo de ensayo, se le añadieron de 1-2 gotas de FeCl<sub>3</sub> al 1% en etanol, la mezcla se dejó reaccionar, la aparición de colores violetas-azules u oscuras se considera prueba positiva.

#### **6.8.5. Ensayo de identificación de triterpenos y esteroides.**

En un tubo de ensayo, aproximadamente 0.05 g de extracto seco se llevaron a 1 ml de cloroformo, una vez disuelto se le agregaron 1 ml de anhídrido acético, se mezcló bien y finalmente se le agregaron a la mezcla 1-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Esta prueba señala la presencia de esteroides y triterpenoides, una reacción de cambio de color (verde para esteroides y rojizos para triterpenoides) se considera positiva para estos compuestos (Aída et al., 2014).

### **6.9. Alcaloides**

La prueba de alcaloides se realizó a partir de 0.5 g de muestra de hongo seco, utilizando como control positivo tabaco y café. Todos los extractos se llevaron a un volumen de HCl al 1% y se llevaron en agitación sónica durante aproximadamente 20 minutos, se dejaron en extracción durante toda la noche, se filtraron y dejaron enfriar. Se tomaron alícuotas de 1 ml de cada extracto y de los controles positivos y se le agregaron 2 gotas de los siguientes reactivos:

### **6.9.1. Reactivo Dragendorff para identificar alcaloides.**

A una solución de 0.8 g de subnitrato de bismuto en 40 ml de agua se le añadieron 10 ml de ácido acético glacial y se mezclan con una solución de 50 ml de solución de loduro de potasio al 40%. Se añadieron 200 ml de ácido acético glacial y se lleva a 1000 ml con agua.

### **6.9.2. Reactivo Mayer para identificar alcaloides.**

A una solución de 13.6 g de cloruro de mercurio (II) en 600 ml de agua se le añaden 100 ml de loduro de potasio al 50%, se completa con agua destilada a 1000 ml. La presencia de alcaloides en el extracto ácido se hace evidente observando un precipitado o turbidez en el tubo de reacción.

### **6.10. Actividad antioxidante DPPH.**

La capacidad antioxidante de los extractos se evaluó a partir de la prueba DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), este es un compuesto que se caracteriza por tener un radical libre, que es cedido ante la presencia de un compuesto antioxidante, de esa manera se puede medir la capacidad de un compuesto (en este caso de los metabolitos presentes en los extractos) de atrapar estos radicales libres. La cuantificación de la actividad antioxidante se realiza a partir de una medición espectrofotométrica a 518 nm.

Para este ensayo 1 g de hongo seco y 5 g de dos productos comerciales con contenido de extracto de *Trametes versicolor* y *Ganoderma lucidum* se llevaron a

extracción con metanol y agua (70:30) en 20 ml toda la noche. 0.5 ml de extracto filtrado se aforaron a 10 ml en solución metanol y agua, finalmente 2 ml del extracto diluido se agregaron a 2 ml de solución DPPH (0.04 mg/ml) en un tubo de ensayo. Se realizó la lectura en un espectrómetro a 518 nm a los 30 minutos de iniciada la prueba. El porcentaje de inhibición fue obtenido de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{ABS_{bco} - ABS_{muestra}}{ABS_{bco}} * 100 \quad (A)$$

Donde:

*ABS Bco.*: Absorbancia de la muestra blanco

*ABS muestra*: Absorbancia de la muestra evaluada

Expresado en mg equivalentes - Trolox:

$$\frac{\% \text{ de inhibición}}{8.2874} = \frac{\mu g \text{ Eq. Trolox}}{\text{ml de sol.}} \quad (B)$$

### 6.11. Determinación del contenido de $\beta$ -Glucanos

Para la identificación de los polisacáridos y específicamente los B-glucanos, se utilizó un kit de determinación de  $\beta$ -glucanos para muestras alimenticias (**KIT MIXED-LINKAGE BETA-GLUCAN "K-BGLU 07/20"**) de Megazyme, el protocolo fue realizado con algunas modificaciones, como se describe a continuación:

Todos los buffers mencionados en el método, así como las enzimas y el reactivo GOPOD fueron preparados a partir del protocolo descrito en el manual del **KIT MIXED-LINKKAGE BETA-GLUCAN “K-BGLU 07/20”** de Megazyme.

- a) Las muestras de hongo seco fueron cortadas en trozos de 5 mm aproximadamente y llevadas a un molino hasta obtener un fino polvo de la muestra, de los cuales 200 mg fueron utilizados para la prueba.
- b) Se agregaron a tubos de ensayo y fueron lavadas con una mezcla de etanol y agua (50% v/v, 1 ml). Se agregó 4 ml de buffer de fosfato de sodio a 20 mM ajustado a pH de 6.5 y se agitaron vigorosamente en un vortex y se llevaron a baño maría durante 60 segundos, se agitaron vigorosamente y nuevamente se llevaron a baño maría durante 2 minutos a 100°C.
- c) Una vez que se encontraron a temperatura ambiente, 0.2 ml de enzima licanasa fueron agregados, los tubos se sellaron y se incubaron a 50°C durante 1 hora, con agitaciones cada 20 minutos.
- d) Una vez terminada la incubación fueron agregados a la mezcla 5 ml de buffer acetato de sodio a 200 mM y ajustado a pH 4, se agitó vigorosamente. Una vez alcanzada la temperatura ambiente los tubos se centrifugaron a 1000 fuerzas g durante 10 minutos.
- e) Alícuotas de 0.1 ml de cada muestra fueron tomadas cuidadosamente y se pasaron a nuevos tubos de ensayo (3 por cada muestra) a dos de ellos se les agregó 0.1 ml de enzima  $\beta$ -glucosidasa que se encontraba en un buffer de acetato de sodio a 50 mM y ajustado a un pH de 4, al tercer tubo (reacción blanco) se le añadió solo 0.1 ml del buffer acetato de sodio.

f) Todos los tubos fueron incubados a 50°C durante 20 minutos. 3 ml de reactivo GOPOD fueron agregados a los tubos y se incubaron nuevamente a 50°C durante 20 minutos, finalmente la reacción fue leída a 510 nm en un espectrofotómetro, comparando los tubos de reacción con su respectivo blanco.

El cálculo del porcentaje de  $\beta$ -glucanos contenido en la muestra se realizó con la metodología descrita en el **KIT MIXED-LINKKAGE BETA-GLUCAN “K-BGLU 07/20”** de Megazyme, con la formula siguiente:

$$\beta\text{-glucan (\% w/w)} = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \times D$$

$$= \Delta A \times \frac{F}{W} \times FV \times D \times 0.9$$

Donde:

**$\Delta A$**  = El resultado de la absorbancia después del tratamiento con  $\beta$ -glucosidasa menos el respectivo blanco.

**F** = Factor de conversión de los valores de absorbancia a micro gramos de glucosa. 100  $\mu$ g de D-glucosa / absorbancia para 100  $\mu$  de D-glucosa.

**FV** = Volumen final (9.4 ml en el método probado para este trabajo).

**0.1** = Volumen de muestra analizada.

**1/1000** = Conversión de  $\mu$ g a mg.



**100/W** = Factor para expresar el contenido de  $\beta$ -glucanos como porcentaje de peso de la muestra.

**W** = Pesos en mg de muestra analizada.

**162/180** = Factor para convertir la D-glucosa libre, tal como se ha determinado, en anhidro-D-glucosa, como ocurre en el  $\beta$ -glucano.

**D**= Dilución adicional antes de la incubación con  $\beta$ -glucosidasa (si es necesario).


## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.




### 7.1. Colecta e identificación morfológica de especies.

Se logró la colecta de diferentes ejemplares de *Ganoderma* en diversas zonas del municipio de Tlajomulco, Zapopan, así como la localización de las especies de *T. versicolor* y *S. commune* en regiones boscosas de Tapalpa y Mezcala. Los ejemplares del género *Ganoderma* fueron colectados en diferentes especies de árboles.

En la tabla 5 se describen los ejemplares estudiados en este trabajo y se señalan las localidades de colección de las mismas.

**Tabla 5.** Imagen, descripción, localización y sustrato de los hongos colectados y estudiados en este trabajo.

<b>Muestra</b>	<b>Descripción</b>	<b>Localización y sustrato</b>
<p data-bbox="215 1163 521 1192"><b><i>Trametes versicolor</i></b></p> 	<p data-bbox="561 1163 1000 1470">Diversidad de colores concéntricos que van del azul al ocre, de consistencia dura como corteza y fuertemente adherido al sustrato, poros blancos.</p>	<p data-bbox="1026 1163 1442 1360">La muestra fue colectada en un árbol muerto en zona alta de bosque de Tapalpa, Jalisco.</p>

<p><b><i>Schizophyllum commune</i></b></p> 	<p>Hongo de color blanco/gris, de láminas pardas, de consistencia aterciopelada al tacto.</p>	<p>La muestra fue colectada de un tronco en la zona de Mezcala, Jalisco</p>
<p><b><i>Ganoderma sessile</i></b></p> 	<p>Hongo sin pie, fuertemente adherido al sustrato y de color rojizo marón, presencia de laca característica del genero <i>Ganoderma</i>, de consistencia dura.</p>	<p>Diferentes ejemplares (tres en total) fueron colectadas de <i>Casuarina equisetifolia</i>, <i>Bauhinia variegata</i> y <i>Eucalyptus sp.</i>, en zonas aledañas de Tlajomulco y Zapopan en el Estado de Jalisco.</p>
<p><b><i>Ganoderma resinaceum</i></b></p> 	<p>Hongo adherido fuertemente al sustrato de colores concéntricos, que van del marrón rojizo a café, borde blanco y/o amarillento, poros blancos que luego son pardos, presencia de laca, de consistencia dura.</p>	<p>Los ejemplares (cuatro en total) fueron colectadas de <i>Eucalyptus sp.</i>, <i>Delonix regia</i> y <i>Casuarina equisetifolia</i>, en zonas aledañas de Tlajomulco en el Estado de Jalisco.</p>

## 7.2. Identificación taxonómica de muestras colectadas.

En la figura 9 se aprecian las características de los ejemplares colectados de *T. versicolor* y *S. commune*. **A1)** Basidiocarpo con líneas concéntricas de colores que

van del azul y gris al pardo y café, características presentes en *T. versicolor* que puede presentar una amplia gama de colores, **A2)** y **A3)** Color de los poros en el ejemplar, estructuras que van del color blanco a ligeramente amarillento o pardo. **B1)** Pequeños basidiocarpos con estructuras en formas de láminas presentes en *S. commune* que van del color pardo al gris y **B2)** superficie del hongo con textura aterciopelada.

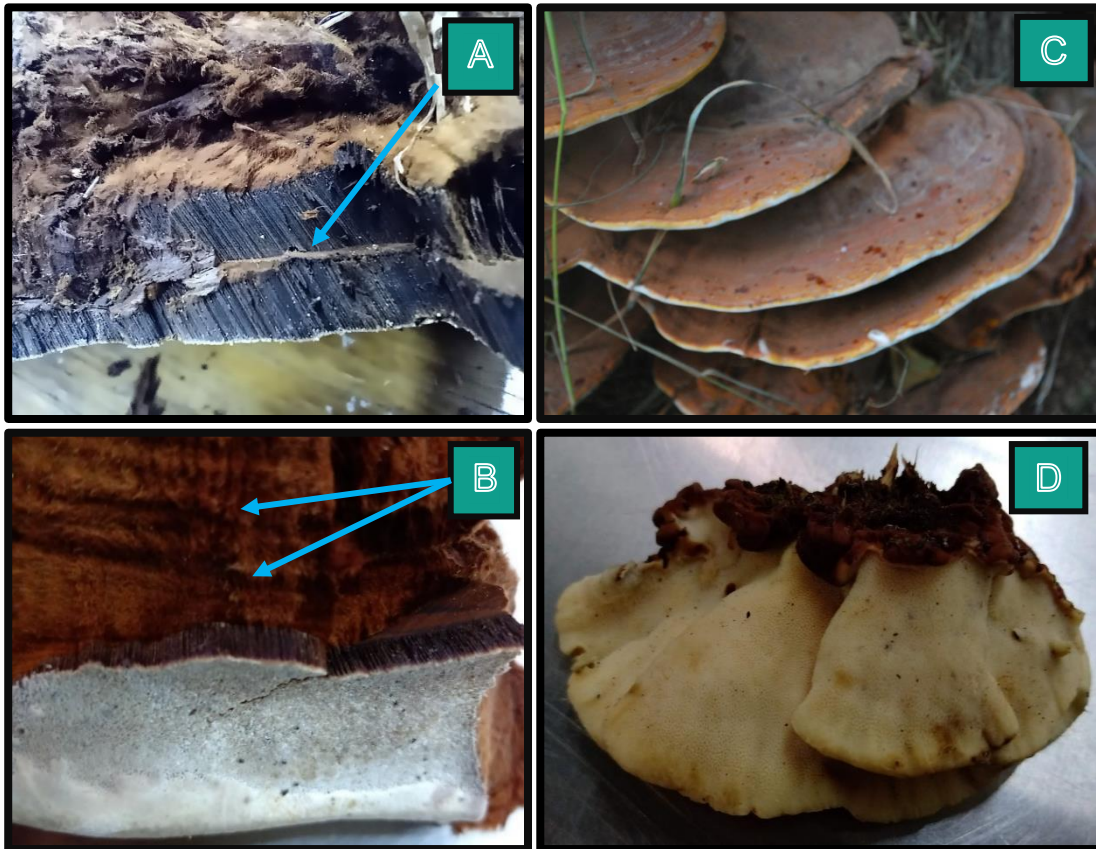


**A1)**= Basidiocarpo de *T. versicolor*. **A2, A3)**= Poros blancos a pardos. **B1)**= Estructuras en formas de láminas de *S. commune*. **B2)** Superficie ligeramente aterciopelada del ejemplar.

**Figura 9.** Características taxonómicas de los ejemplares de *T. versicolor* y *S. commune*

### **Descripción del complejo *Ganoderma*.**

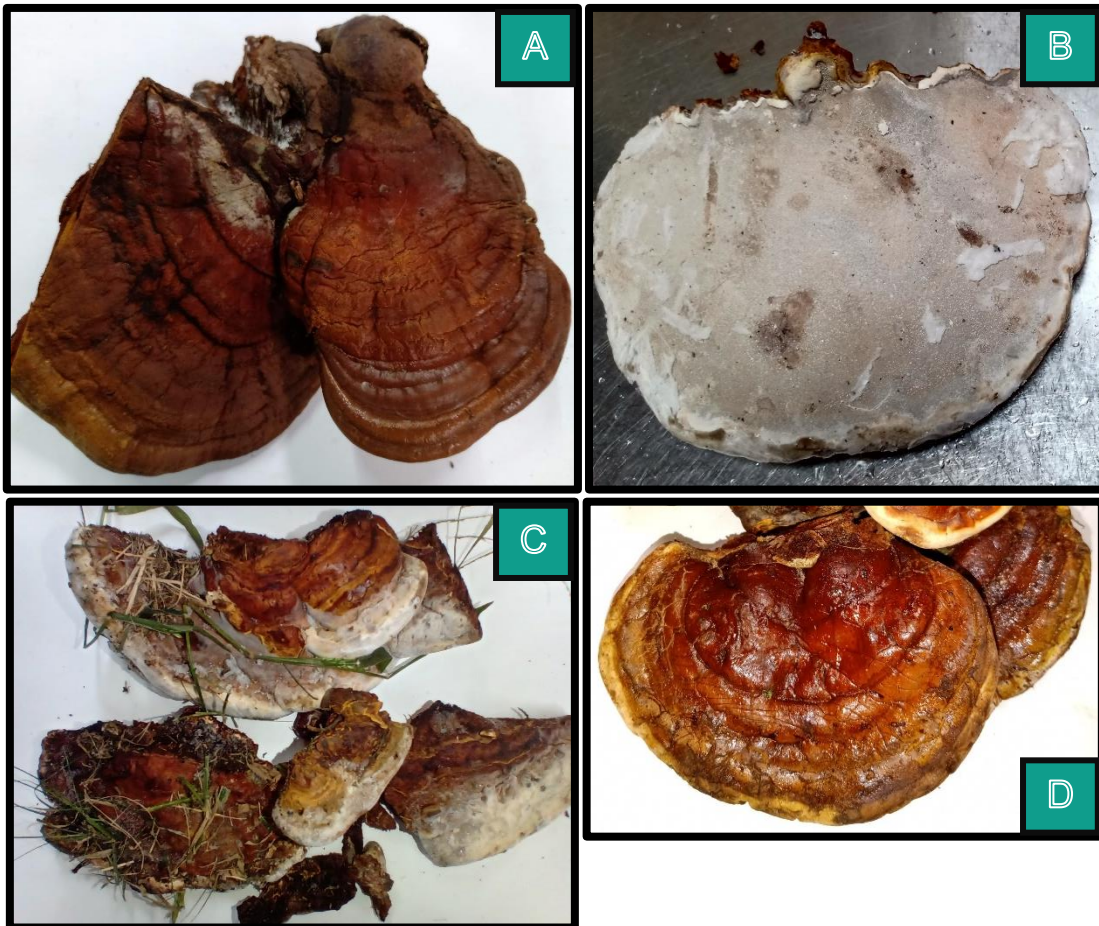
La figura 10 muestra las características del cuerpo fructífero, correspondiente al ejemplar colectado de *Ganoderma* identificado. **A)** Líneas de crecimiento concéntrico del cuerpo fructífero, características de *G. sessile*, (Loyd *et al.*, 2018), **B)** cuerpo fructífero adherido al sustrato, puede notarse las líneas blancas en el borde del hongo, características propias de varias especies del género *Ganoderma*. **C)** estructura que forma parte de los poros, de alrededor de 1.5 cm de largo, puede apreciarse una capa sobrepuesta a los mismos, característica que en ocasiones se presenta en *G. sessile*. **D)** Poros blanquecinos, características que presentan los ejemplares del género *Ganoderma*.



**A)**= Doble capa de poros, reportado en algunos ejemplares de *G. sessile*.  
**B)**= Líneas de crecimiento. **D)**= Poros blancos característicos de la especie. **C)**= Cuerpos fructíferos de *G. sessile*, borde blanco/amarillento.

**Figura 10.** Características taxonómicas de las especies *G. sessile* colectadas.

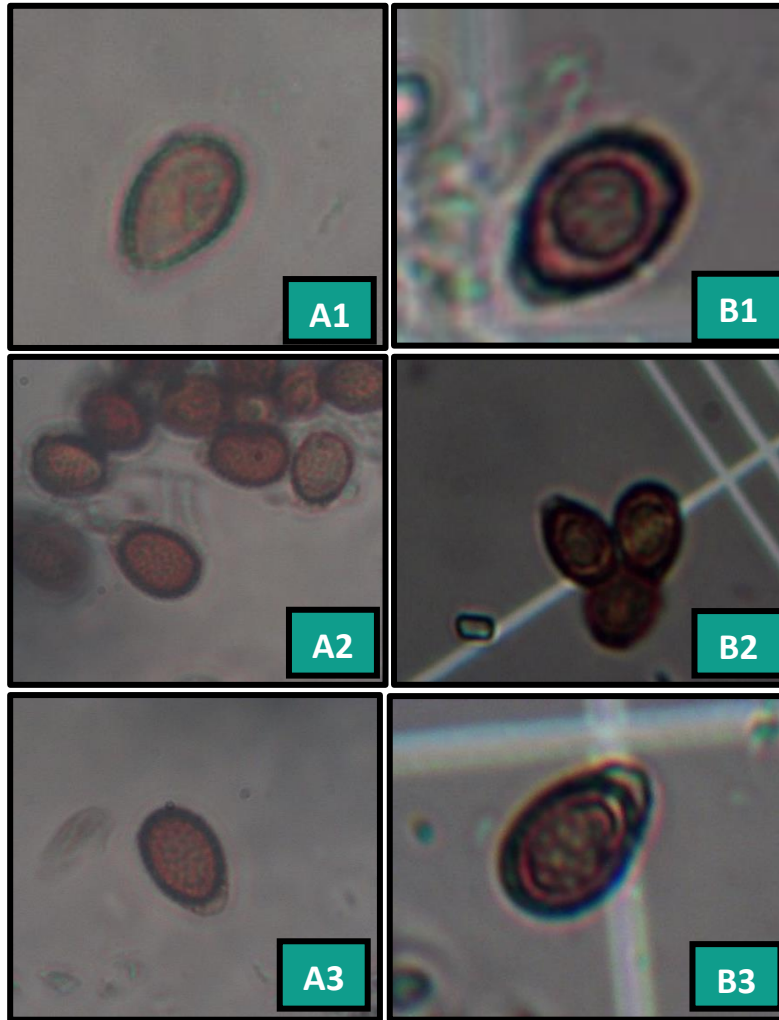
La figura 11 señala algunas características de los ejemplares del género *G. resinaceum* colectados, **A)** y **D)** muestra la característica laca, presente en la mayoría de especies *Ganoderma*. En **B)** se puede apreciar los poros blancos del ejemplar.



**A) y D)**= cuerpos fructíferos de *G. resinaceum* con borde amarillento y presencia de resina característica de la especie. **B) y C)**= poros blancos presentes en los ejemplares colectados.

**Figura 11.** Características taxonómicas de las especies *G. resinaceum* colectadas.

La figura 12 muestra las esporas obtenidas de los ejemplares colectados, Torres-Torres y colaboradores describen las esporas de algunas especies del complejo *G. sessile* (debido a la forma sesiliforme en la que crecen), que incluye a las especies *G. resinaceum* y *G. sessile*, la descripción de las esporas fotografiadas para este estudio concuerda con las características reportadas en otros trabajos (Lloyd *et al.*, 2018).



**A1-A3=** Basidiosporas de *G. resinaceum*. **B1-B3=** Basidiosporas de *G. sessile*.

**Figura 12.** Basidiosporas vistas al microscopio

La revisión de las características de las esporas, con lo reportado por Torres-Torres y colaboradores (2015), tanto *G. resinaceum* como *G. sessile*, han sido localizados en México, en las zonas templadas del territorio, en Jalisco *G. sessile* ha sido colectado en zonas de Zapopan y Ajijic, los ejemplares de este trabajo, como ya se mencionó, pertenecen a las zonas de Zapopan y Tlajomulco principalmente.



La tabla 6 agrupa los ejemplares colectados así como el sustrato correspondiente y las claves utilizadas para su fácil identificación en el documento, además se mencionan los productos de importación utilizados en comparación en los análisis fitoquímicos.

**Tabla 6.** Ejemplares de hongos colectados para el estudio, origen y claves de identificación de las muestras.

CLAVE	MUESTRA	SUSTRATO / ORIGEN
GrE	<i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>
GrDR	<i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>Delonix regia</i>
GrC	<i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>Casuarina equisetifolia</i>
GsC	<i>Ganoderma sessile</i>	<i>Casuarina equisetifolia</i>
GsBV	<i>Ganoderma sessile</i>	<i>Bauhinia variegata</i>
GsE	<i>Ganoderma sessile</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>
GsAM	<i>Ganoderma sessile</i>	Árbol muerto
GAM	<i>Ganoderma sp.</i>	Árbol muerto
T.v.	<i>Trametes versicolor</i>	Árbol muerto
S.c.	<i>Schizophyllum commune</i>	Árbol muerto
P1	Producto comercial con extracto de <i>T. versicolor</i>	Cápsulas
P2	Producto comercial con extracto de <i>G. lucidum</i>	Cápsulas

Es importante mencionar que para la muestra GAM no fue posible precisar la especie a la que pertenece, sin embargo se llevó a cabo el estudio fitoquímico con la finalidad de comparar con otras muestras *Ganoderma* en este estudio.

### **7.3. TLC para identificación de principales metabolitos.**

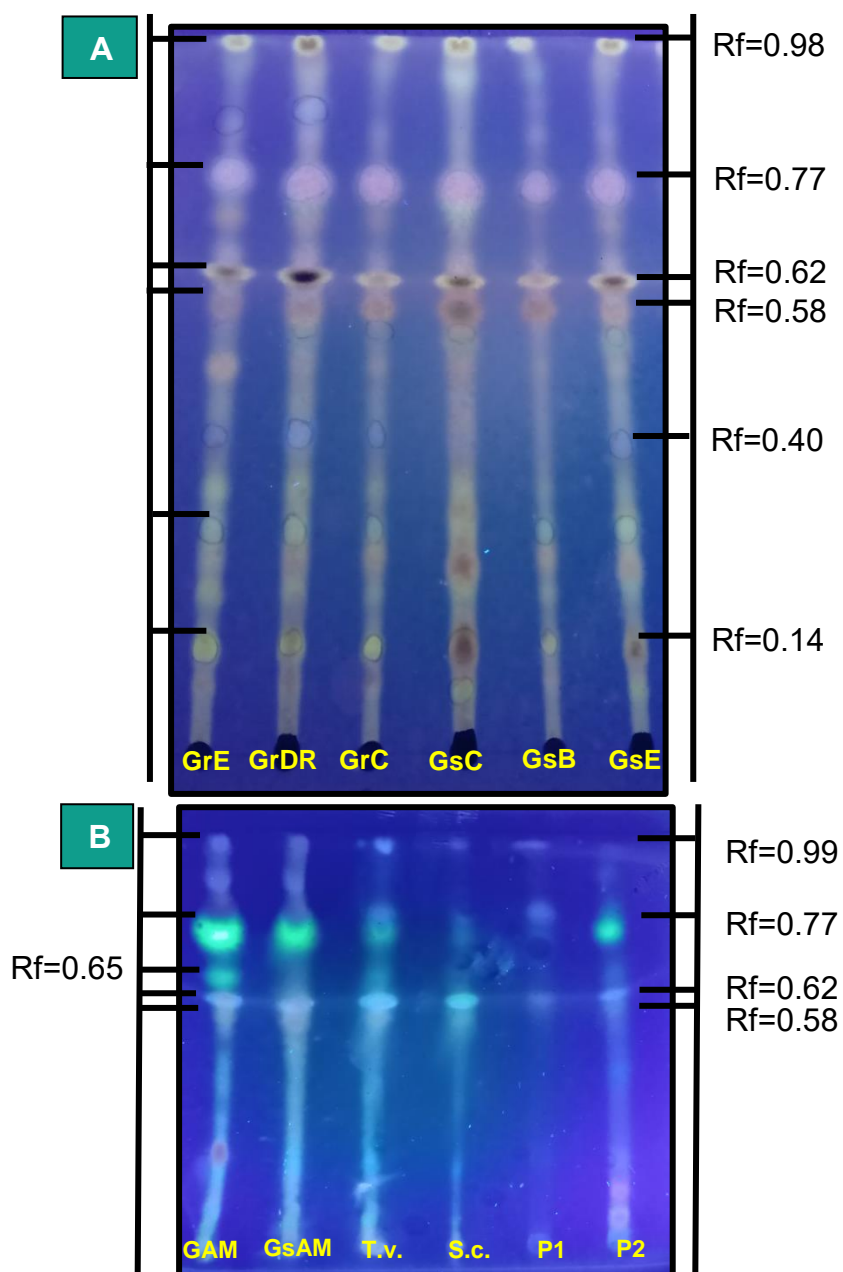
A través de técnicas de TLC, se llevó a cabo la identificación de principales metabolitos a partir de extractos metanólicos de ocho muestras de hongos del género *Ganoderma*, una muestra correspondiente a *T. versicolor* y una más de *S. commune*. Los resultados se compararon con las propiedades químicas de dos productos que actualmente se encuentran en el mercado nacional, un producto que contiene extracto comercial de *T. versicolor* (Producto1) y otro con extracto comercial de *G. lucidum* (Producto2).

La figura 13 (A-B), muestra el resultado de asperjar la placa TLC con el reactivo Lieberman-Burchard (LB), y los Rf calculados de las manchas obtenidas. En general se observa en la mayoría de las muestras, la identificación de saponinas (Rf=0.77) así como de metabolitos que presentan, según la reacción observada, una estructura lactónica (Rf= 0.62) que se identifica con manchas de color gris oscuro al centro.

Otros metabolitos de interés identificados corresponden a triterpenos, los cuales se indican en color morado y fueron revelados con el Rf=0.40; en el Rf=0.14 se presentan manchas amarillas que corresponden a compuestos amargos con la excepción de las muestras GsC y GsE, en dónde el mismo Rf=0.14 indicó manchas de color café, que son positivas para lactonas.

Cabe mencionar que en la muestra de *Ganoderma sp.* (GAM) se observaron dos metabolitos que, al asperjar con el reactivo (LB), se tornaron de color verde, lo que puede indicar que cuenta con dos metabolitos de características esteroidales ( $R_f=0.77$  y  $0.65$ ), propiedad que no se aprecia en otros extractos de muestras *Ganoderma*.

En lo que respecta a los productos de comparación, de manera visual, se aprecian algunas similitudes fitoquímicas, principalmente en la presencia de los metabolitos identificados con el  $R_f=0.77$  y  $0.62$  correspondientes a compuestos esteroidales y lactónicos respectivamente, sin embargo los mismos se encuentran a una menor concentración con respecto a lo presente en hongos colectados.

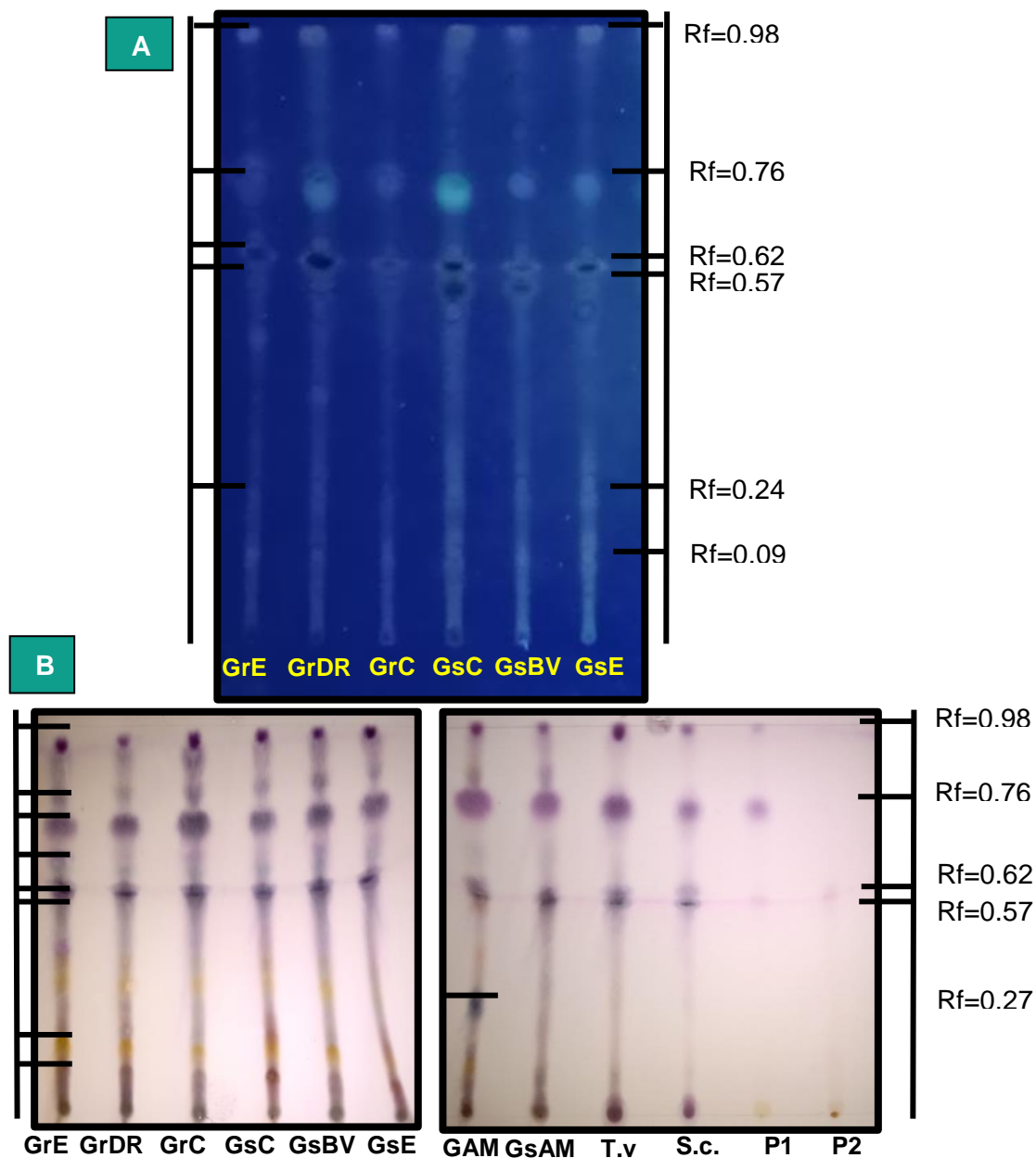


**GrE**= *G. resinaceum/Eucalyptus sp.* **GrDr**= *G. resinaceum/Delonix regia.* **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia.* **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia.* **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata.* **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **GAM**= *Ganoderma sp.* **GsAM**= *G. sessile/árbol muerto.* **T.v.**= *T. versicolor.* **S.c.** = *S. commune.* **P1**= producto comercial 1. **P2**= Producto comercial 2.

**Figura 13.** Placas TLC revelada con reactivo Lieberman-Burchard.

La figura 14 muestra las placas TLC luego de ser reveladas con reactivo anilsaldehído. En A) se aprecian reacciones en azul/verde  $R_f=0.76$ , lo que puede indicar que los metabolitos identificados poseen una estructura compleja que incluye un grupo esteroide;  $R_f= 0.62$  en color gris o café oscuros, que indican glucósidos cardiotónicos, además en color rosa indicado con el  $R_f=0.57$ , podría señalar saponinas o triterpenos. El  $R_f$  señalado con 0.27, presente en el extracto GAM es una característica ausente en el resto de las muestras.

En lo que respecta a los productos de comparación, en el producto que contiene extracto de *T. versicolor* se aprecia la presencia de un metabolito con  $R_f= 0.76$  y  $R_f= 0.62$ , que también se aprecia en el producto que contiene extracto de *G. lucidum* ambos en una concentración menor en comparación con las muestras de hongos colectadas.



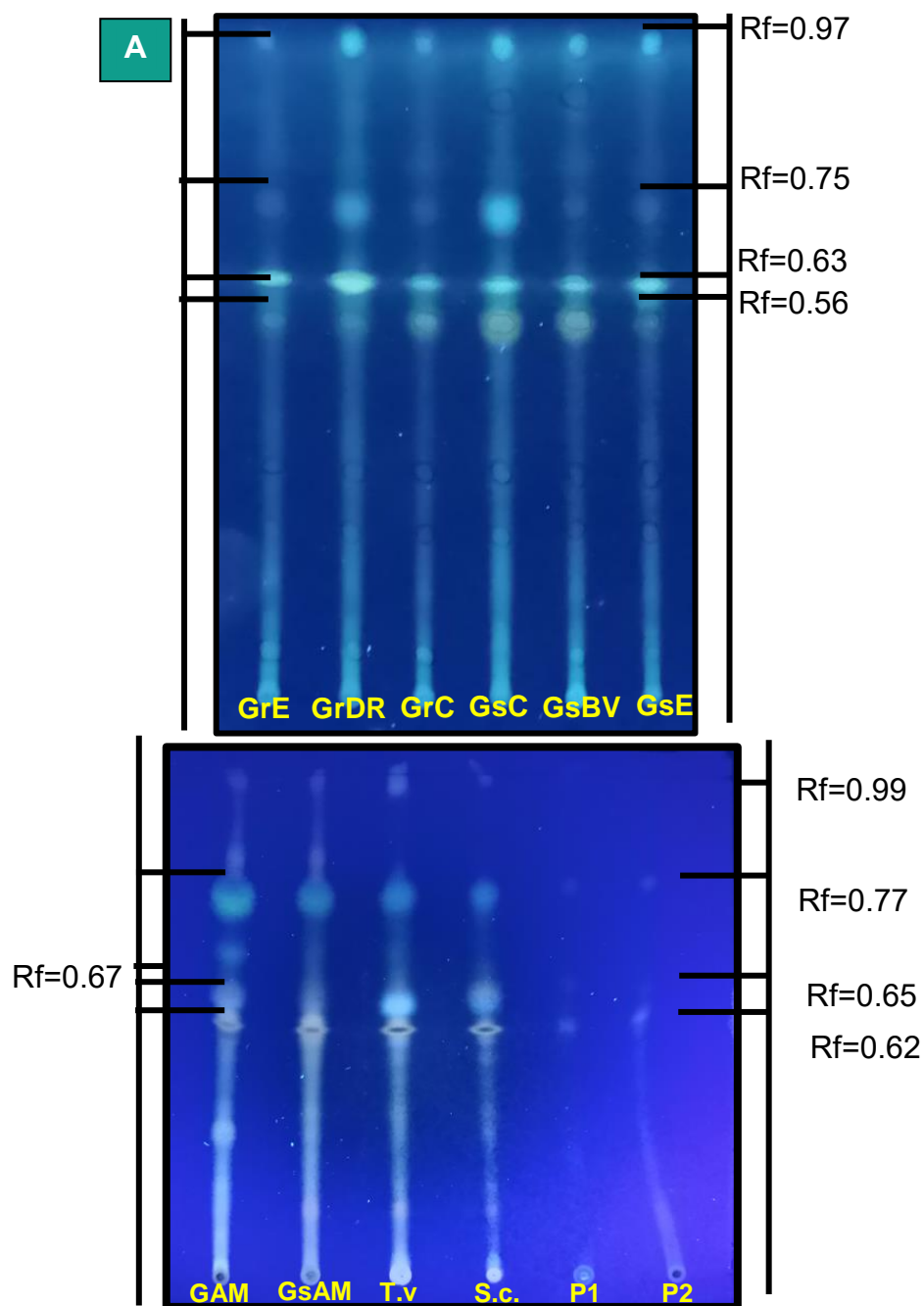
A) Visualizado a 320 nm y B) muestras en comparación con productos prototipo. **GrE**= *G. resinaceum/Eucalyptus sp.* **GrDr**= *G. resinaceum/Delonix regia.* **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia.* **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia.* **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata.* **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **GAM**= *Ganoderma sp.* **GsAM**= *G. sessile/árbol muerto.* **T.v**= *T. versicolor.* **S.c.** = *S. commune.* **P1**= producto comercial 1. **P2**= Producto comercial 2.

**Figura 14.** Placas TLC, reveladas con reactivo Anilsaldehído.

La figura 15 muestra placas TLC reveladas con el reactivo Cloruro de antimonio, los compuestos identificados con  $R_f=0.56$  reaccionaron al asperjar la placa tornándose de color amarillo, lo que sugiere la presencia de esteroides. En B) los metabolitos identificados con  $R_f=0.62$  aparecieron después de asperjar y calentar la placa. La coloración azul brillante indica presencia de triterpenos

En las placas TLC, los extractos identificadas como GrDR y GsE demostraron una concentración mayor del compuesto identificado con el  $R_f=0.75$ . Para el compuesto identificado con el  $R_f=0.63$  se observó en mayor concentración en GrDR, GsC y GsE. Los extractos GsC, GsBV y T.v. mostraron mayor concentración del compuesto identificado como posible lactona ( $R_f: 0.63$ ).

Nuevamente P1 y P2 presentaron una concentración más baja en los metabolitos fitoquímicos encontrados.



**GrE**= *G. resinaceum/Eucalyptus sp.* **GrDR**= *G. resinaceum/Delonix regia.* **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia.* **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia.* **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata.* **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **GAM**= *Ganoderma sp.* **GsAM**= *G. sessile/árbol muerto.* **T.v**= *T. versicolor.* **S.c.** = *S. commune.* **P1**= producto comercial 1. **P2**= Producto comercial 2.

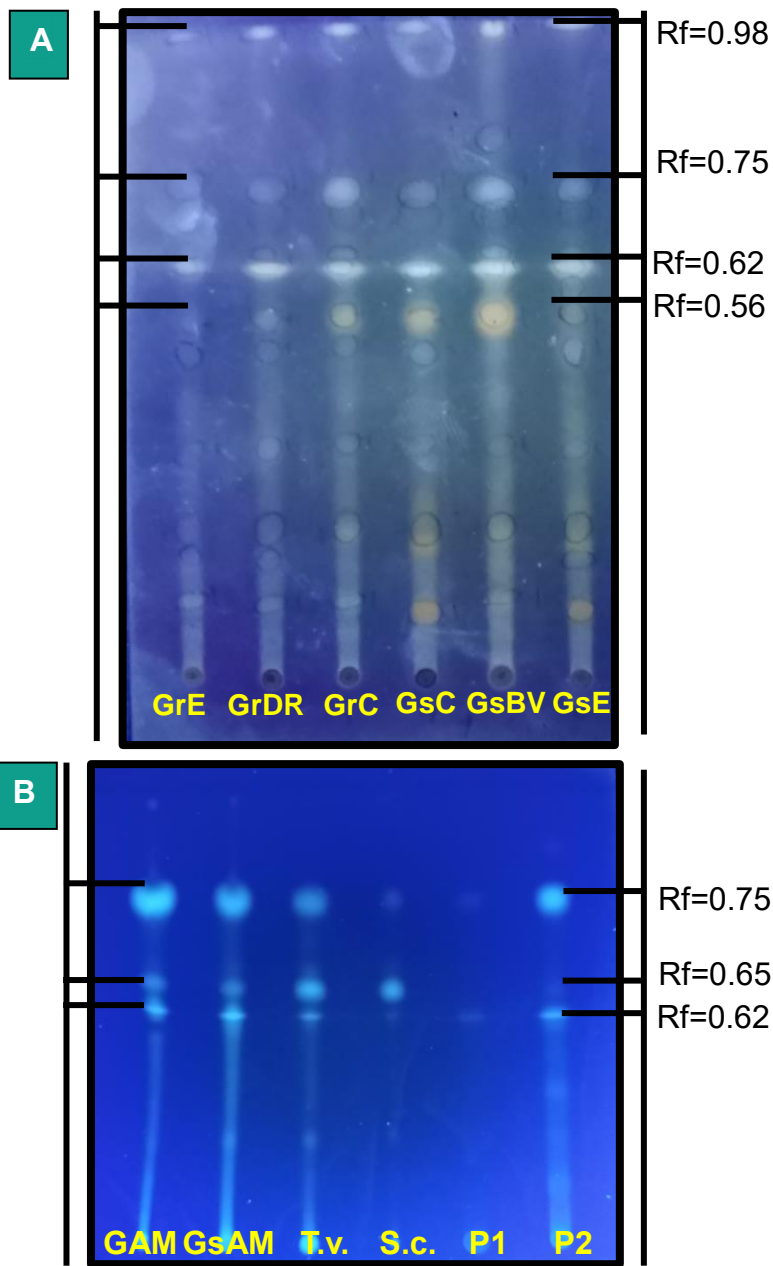
**Figura 15.** Placas TLC, reveladas con cloruro de antimonio.



En la figura 16 se aprecia el resultado de placas TLC asperjadas con reactivo ácido p-toluensulfónico, los metabolitos identificados con  $R_f=0.62$  y  $0.75$  son positivos para esteroides, ya que se volvieron fluorescentes al calentar la placa una vez asperjada.

Otras reacciones incluyen el  $R_f=0.56$  que se tornó amarillo al asperjar la placa, además en los extractos identificados como GsC y GsE se aprecian compuesto con una reacción similar, identificados con  $R_f= 0.16$  y  $0.10$ .

En **B)** los compuestos identificados con  $R_f= 0.65$  aparecieron solo después de asperjar la placa con ácido p-toluensulfónico, y a la luz UV 365 nm se observan de color azul.



**GrE**= *G. resinaceum*/*Eucalyptus* sp. **GrDR**= *G. resinaceum*/*Delonix regia*. **GrC**= *G. resinaceum*/*Casuarina equisetifolia*. **GsC**= *G. sessile*/*Casuarina equisetifolia*. **GsBV**= *G. sessile*/*Bauhinia variegata*. **GsE**= *G. sessile*/*Eucalyptus* sp. **GAM**= *Ganoderma* sp. **GsAM**= *G. sessile*/árbol muerto. **T.v.**= *T. versicolor*. **S.c.** = *S. commune*. **P1**= producto comercial 1. **P2**= Producto comercial 2.

**Figura 16.** Placas TLC, reveladas con reactivo ácido p-toluensulfónico.

A manera de resumen, las tablas 7 a la 17 agrupan los diferentes metabolitos identificados de los extractos metanólicos de los hongos de *G. resinaceum* (GrE, GrDR, GrC), *G. sessile* (GsC, GsBV, GsE, GsAM), una muestra del género *Ganoderma* de la cual no se ha precisado la especie, extractos de *T. versicolor* y *S. commune*, así como productos de importación que contienen extractos comerciales de *T. versicolor* y *S. commune*.

La información obtenida indica que todos los ejemplares comparten similitud en ciertas características fitoquímicas importantes. Con base en los resultados mostrados en las tablas se distingue, la presencia de 3 metabolitos principales en los extractos de hongos y productos comerciales. El primero de ellos identificado con el  $R_f=0.98$ , presente todos los extractos del estudio, las reacciones de coloración con los diferentes reactivos indican que dicho metabolito puede tratarse de compuestos amargos y/o lactonas, existe también similitud en la presencia del compuesto identificado con  $R_f= 0.77$ , presente en todos los extractos, en la mayoría de ellos la reacción indica que se trata de un compuesto de características esteroides (coloración verde), en algunos otros indica presencia de saponinas esteroidales y triterpenos (coloración rosa en TLC con reactivo Lieberman-Burchard por ejemplo), un tercer metabolito presente en todos los extractos, identificado con el  $R_f= 0.62$  posee, según los resultados analizados, una estructura compleja, de características esteroide, así como positivo para compuestos lactónicos, pudiendo corresponder a metabolitos como los glucósidos cardiotónicos dado que este tipo de compuestos tienen dichas características en sus estructuras.

**Tabla 7.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *G. resinaceum* / *Eucalyptus* sp.

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		Ácido p-toluensulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
GrE	0.98	café	0.98	marrón	0.97	blanco	0.98	blanco
	0.77	morado claro	0.76	café	0.75	azul	0.75	verde claro
	0.71	verde	0.75	verde claro	0.63	amarillo	0.62	
	0.62	café oscuro	0.62	marrón obscuro	0.56	amarillo opaco	0.35	morado
	0.58	café	0.57	café	0.25	violeta	0.12	morado
	0.40	morado	0.40	morado			0.10	verde claro
	0.14	amarillo	0.24	morado claro				
		0.09	rojizo					

**GrE=** *G. resinaceum* localizado en *Eucalyptus* sp. **Rf=** Frente de retención calculado

**Tabla 8.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *G. resinaceum* / *Delonix regia*.

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluensulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
GrDR	0.98	café	0.98	marrón	0.97	blanco	0.98	blanco
	0.77	morado claro	0.76	café	0.75	azul	0.75	verde claro
	0.71	verde	0.75	verde claro	0.63	amarillo	0.62	
	0.62	café oscuro	0.62	marrón obscuro	0.56	amarillo opaco	0.50	morado
	0.58	café	0.57	café	0.25	violeta	0.35	morado
	0.40	morado	0.40	morado			0.12	morado
	0.14	amarillo	0.24	morado claro			0.10	verde claro
		0.09	rojizo					

**GrDR=** *G. resinaceum* localizado en *Delonix regia*. **Rf=** Frente de retención calculado

**Tabla 9.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *G. resinaceum* / *Casuarina equisetifolia*

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluensulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
GrC	0.98	café	0.98	marrón	0.97	blanco	0.98	blanco
	0.77	morado claro	0.76	café	0.75	azul	0.75	verde claro
	0.62	café oscuro	0.75	verde claro	0.63	amarillo	0.62	
	0.58	café/rosa	0.62	marrón oscuro	0.56	amarillo opaco	0.50	morado
	0.40	morado	0.57	café	0.25	violeta	0.35	morado
	0.14	amarillo	0.40	morado			0.10	verde
			0.24	morado claro				
		0.09	rojizo					

GrDR= *G. resinaceum* localizado en *Casuarina*. Rf= Frente de retención calculado

**Tabla 10.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *G. sessile* / *Casuarina equisetifolia*

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluensulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
GsC	0.98	café	0.98	marrón	0.97	blanco	0.98	blanco
	0.77	morado claro	0.76	café	0.75	azul	0.75	verde claro
	0.71	verde	0.75	verde claro	0.63	amarillo	0.62	
	0.62	café oscuro	0.62	marrón oscuro	0.56	amarillo opaco	0.50	morado
	0.58	café	0.57	café	0.25	violeta	0.35	morado
	0.40	morado	0.40	morado			0.09	anaranjado
	0.14	café	0.24	morado claro				
	0.08	amarillo	0.09	rojizo				

GsC= *G. sessile* localizado en *Casuarina*. Rf= Frente de retención calculado

**Tabla 11.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *G. sessile* / *B. variegata*

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluenosulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
GsBV	0.98	Café	0.98	Marrón	0.97	Blanco	0.98	Blanco
	0.77	Morado claro	0.76	Café	0.75	azul	0.75	Verde claro
	0.62	Café oscuro	0.75	verde claro	0.63	amarillo	0.62	
	0.58	café	0.62	Marrón oscuro	0.56	amarillo opaco	0.50	morado
	0.14	Amarillo	0.57	Café	0.25	Violeta	0.35	morado
			0.40	morado			0.10	Verde claro
			0.24	Morado claro				
0.09			Rojizo					

**GsBV=** *G. sessile* localizado en *B. variegata*. **Rf=** Frente de retención calculado

**Tabla 12.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *G. sessile* / *Eucalyptus* sp.

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluenosulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
GsE	0.98	Café	0.98	Marrón	0.97	Blanco	0.98	Blanco
	0.77	Morado claro	0.76	Café	0.75	azul	0.75	Verde claro
	0.62	Café oscuro	0.75	verde claro	0.63	amarillo	0.62	
	0.58	café	0.62	Marrón oscuro	0.56	amarillo opaco	0.50	morado
	0.40	morado	0.57	Café	0.25	Violeta	0.35	morado
	0.14	café	0.40	morado			0.12	morado
			0.24	Morado claro			0.09	anaranjado
		0.09	Rojizo					

**GsE=** *G. sessile* localizado en *Eucalyptus* sp., **Rf=** Frente de retención calculado

**Tabla 13.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *G. sessile*/árbol muerto

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anisaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluensulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
<b>GsAM</b>	0.98	rosa opaco	0.99	violeta	0.99	rosa	0.76	azul
	0.80	rosa	0.78	violeta	0.80	rosa	0.65	azul
	0.78	Verde	0.62	morado	0.77	verde	0.62	azul
	0.62	rosa			0.62	amarillo con mancha oscura al centro		
	0.58	rosa						
	0.24	azul claro						

**GsAM**= *G. sessile* localizado en tronco de un árbol muerto. **Rf**= Frente de retención

La tabla 14 corresponde a los diferentes metabolitos presentes en el extracto metanólico obtenido de una muestra de hongo del género *Ganoderma*, en dónde puede observarse la presencia de dos compuestos esteroides identificados con Rf=0.78 y 0.65 en las placas reveladas con reactivo Lieberman-Burchard, indicando color verde en ambos, característica no presente en el resto de los extractos obtenidos a partir de hongos del género *Ganoderma* en este estudio.

En el mismo extracto se identifica un metabolito con el Rf=0.27, que reacciona en color violeta con el reactivo Lieberman-Burchard lo que puede indicar la presencia de un compuesto triterpénico.

**Tabla 14.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *Ganoderma* sp.

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluensulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
GAM	0.98	rosa opaco	0.99	violeta	0.99	rosa	0.76	azul
	0.80	rosa	0.78	violeta	0.80	rosa	0.65	azul
	0.78	Verde	0.62	morado	0.77	verde	0.62	azul
	0.65	verde	0.27	morado intenso	0.67	verde		
	0.62	rosa			0.65	amarillo		
	0.58	rosa			0.62	mancha oscura al centro		
	0.27	violeta			0.27	amarillo		
	0.21	azul claro						

**G.M.**= Hongo *Ganoderma* sin definir especie. **Rf**= Frente de retención calculado

**Tabla 15.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *T. versicolor*.

Rf CALCULADOS Y REACCIONES EN PLACAS TLC REVELADAS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluenosulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
T.v.	0.98	rosa opaco	0.99	violeta	0.99	rosa	0.76	azul
	0.8	rosa	0.78	violeta	0.77	azul	0.65	azul
	0.78	Verde	0.62	morado	0.65	amarillo	0.62	azul
	0.62	azul			0.62	mancha oscura al centro		
	0.58	rosa						
	0.27	azul claro						

**T.v.**= *Trametes versicolor*. **Rf**= Frente de retención calculado



**Tabla 16.** Rf y reacciones en placas TLC para la muestra de *S. commune*.

PERFIL FITOQUÍMICO DE LAS CEPAS DE HONGOS COLECTADOS								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluenosulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
S.c.	0.98	rosa opaco	0.99	violeta	0.99	rosa	0.76	azul
	0.78	Verde	0.78	violeta	0.77	azul	0.65	azul
	0.62	azul	0.62	morado	0.65	morado	0.62	azul
	0.58	verde			0.62	amarillo con mancha oscura al centro		
	0.27	azul claro						

**S.c.**= *Schizophyllum commune*. **Rf**= Frente de retención calculado

En la tabla 17 se agrupan los metabolitos presentes en los productos que contienen extractos comerciales de *T. versicolor* y *G. lucidum*, se observa la presencia de, principalmente, metabolitos de características esteroides y triterpenos y la aparente ausencia de lactonas y/o compuestos amargos que sí están presentes en los extractos obtenidos de las muestras de hongos colectadas.

**Tabla 17.** Rf y reacciones en placas TLC para los extractos comerciales de *T. versicolor* y *G. lucidum*.

PERFIL QUÍMICO DE PRODUCTOS DE IMPORTACIÓN								
Muestra	Lieberman-Burchard		Anilsaldehído		Cloruro de antimonio		p-toluenosulfónico	
	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación	Rf	Indicación
P1	0.98	rosa opaco	0.99	violeta	0.62	rosa	0.76	azul
	0.80	rosa	0.78	violeta			0.65	azul
	0.62	rosa	0.62	morado			0.62	azul
P2	0.80	rosa	0.62	morado	0.62	rosa	0.76	azul

	0.78	verde			0.65	azul
	0.62	rosa			0.62	azul

**P1**= Extracto comercial de *T. versicolor*. **P2**= Extracto comercial de *G. lucidum*. **Rf**= Frente de retención calculado.

#### 7.4. TLC para identificación de Lactonas.

Para el reactivo de Baljet y Lieberman las lactonas se presentan con coloración café sobre la placa revelada con hidroxilamina ferrosa, las cuales se observan como manchas brillantes a luz UV (365 nm).

La tabla 18 señala la relación de resultados para la identificación de lactonas mediante la reacción con reactivo Baljet, comparada con la identificación para el reactivo Lieberman e hidroxilamina ferrosa para compuestos lactónicos.

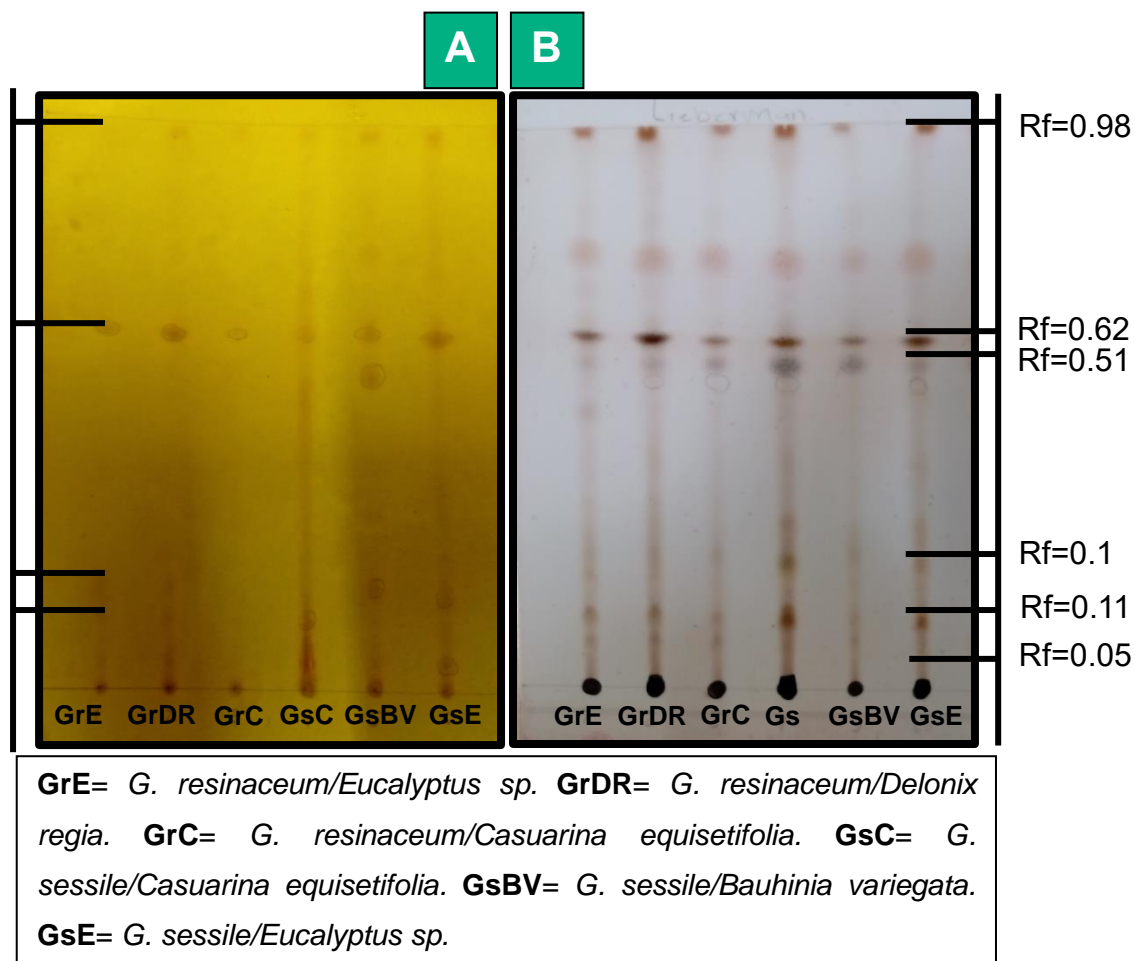
**Tabla 18.** Identificación de compuestos lactónicos en TLC mediante la comparación de las reacciones de tres diferentes reactivos.

<i>Muestra</i>	<i>Baljet</i>		<i>Lieberman</i>		<i>Hidroxilamina ferrosa</i>	
	Rf	Reacción	Rf	Coloración	Rf	Reacción
<b>GrE</b>	0.98	+	0.98	café	0.98	+
	0.62	+	0.62	Café oscuro	0.62	+
	0.17	+	0.17	café		
	0.11	+	0.11	café		
<b>GrDR</b>	0.98	+	0.98	café	0.98	+
	0.62	+	0.62	Café oscuro	0.62	+
	0.17	+	0.17	café		
	0.11	+	0.11	café		
<b>GrC</b>	0.98	+	0.98	café	0.98	+
			0.62	Café oscuro		
	0.62	+	0.17	Café	0.62	+
			0.11	café		
<b>GsC</b>	0.98	+	0.98	café	0.98	+
	0.62	+	0.62	Café oscuro	0.62	+

	0.11	+	0.17	Café		
			0.11	Café		
<b>GsBV</b>	0.98	+	0.98	café	0.98	+
	0.62	+				
	0.54	+	0.62	Café oscuro		
	0.17	+	0.17	café	0.62	+
	0.05	+				
<b>GsE</b>	0.98	+	0.98	café	0.98	+
	0.62	+	0.62	Café oscuro	0.62	+
	0.17	+				
	0.11	+	0.17	café		
	0.05	+				

**GrE**= *G. resinaceum/Eucalyptus sp.* **GrDr**= *G. resinaceum/Delonix regia.* **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia.* **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia.* **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata.* **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.*

La figura 17 señala los compuestos lactónicos observados por la reacción de Lieberman, confirmados por el reactivo de Baljet.



**Figura 17. A)** Placa TLC con reactivo Baljet, **B)** placa TLC con reactivo Lieberman-Burchard.

La placa asperjada con el reactivo de Baljet confirmó la presencia de lactonas para el Rf=0.98 y Rf=0.62 para los extractos GrE, GrDR, GrC, GsC, GsBV, GsE, además en GrE, GrDR, GsC, y GsE se detectó la presencia de lactonas en Rf= 0.11, las cuales también fueron detectadas por el reactivo de Kedde, que permanecieron visibles cambiando a color café.

Para este trabajo se considera como compuestos lactónicos aquellos que están confirmados con el reactivo Baljet, (Rf=0.98, 0.62, 0.11). Lo anterior confirma la

presencia de una estructura lactónica presente en el metabolito identificado con el  $R_F=0.62$ .

### 7.5. TLC para identificación de Glucósidos cardiotónicos.

La tabla 19 agrupa los resultados obtenidos de la identificación de Glucósidos cardiotónicos en placas TLC. Para revelar la presencia de estos metabolitos se comparó la reacción de Kedde con lo mostrado en la reacción de Lieberman, ambos reaccionaron con el grupo lactónico con la diferencia de que el reactivo de Kedde reacciona cuando una estructura lactónica está unida a un grupo de naturaleza esteroide. La evidencia de ello es que la reacción de Kedde no permanece al encontrarse con glucósidos cardiotónicos y si lo hace en presencia de lactonas; por otro lado los reactivos p-toluensulfónico y cloruro de antimonio detectaron la presencia de compuestos con estructuras esteroidales, lo anterior concuerda con la prueba de Kedde en TLC la cual fue positivo para glucósidos, compuestos que en su estructura existe un grupo lactónico y un grupo esteroide unido a una cadena de azúcares.

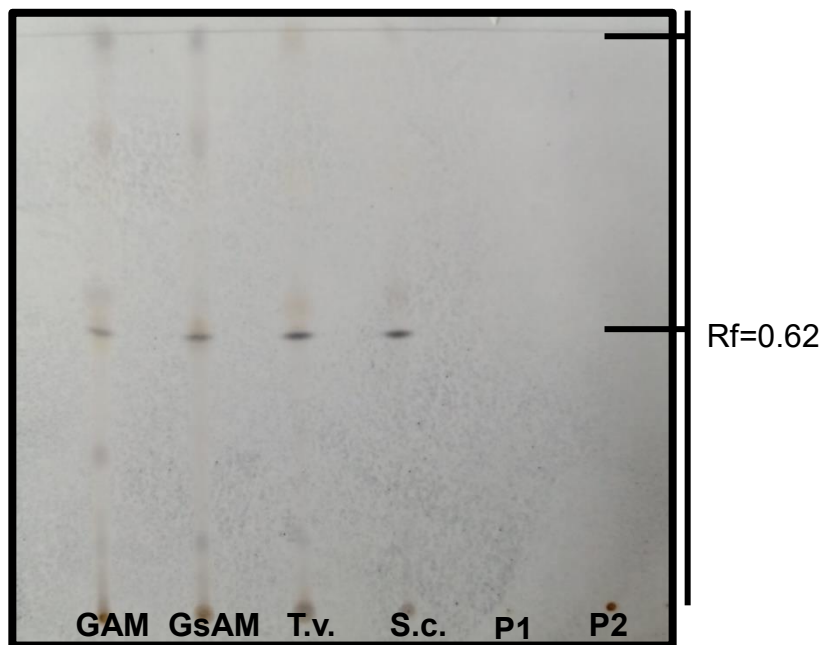
**Tabla 19.** Comparación de  $R_f$  y reacción sobre placa TLC para identificación de lactonas.

Muestra	Kedde		Lieberman	
	$R_f$	Reacción	$R_f$	Reacción
GrE	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
	0.11	Violeta que cambia a café	0.11	Café claro
GrDR	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
	0.11	Violeta que cambia a café	0.11	Café claro

<b>GrC</b>	0.11	Violeta qué cambia a café	0.11	Café claro
<b>GsC</b>	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
	0.11	Violeta qué cambia a café	0.11	Café claro
<b>GsBV</b>	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
<b>GsE</b>	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
	0.11	Violeta qué cambia a café	0.11	Café claro
<b>GsAM</b>	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
<b>GAM</b>	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
<b>T.v.</b>	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro
<b>S.c.</b>	0.62	Violeta	0.62	Café oscuro

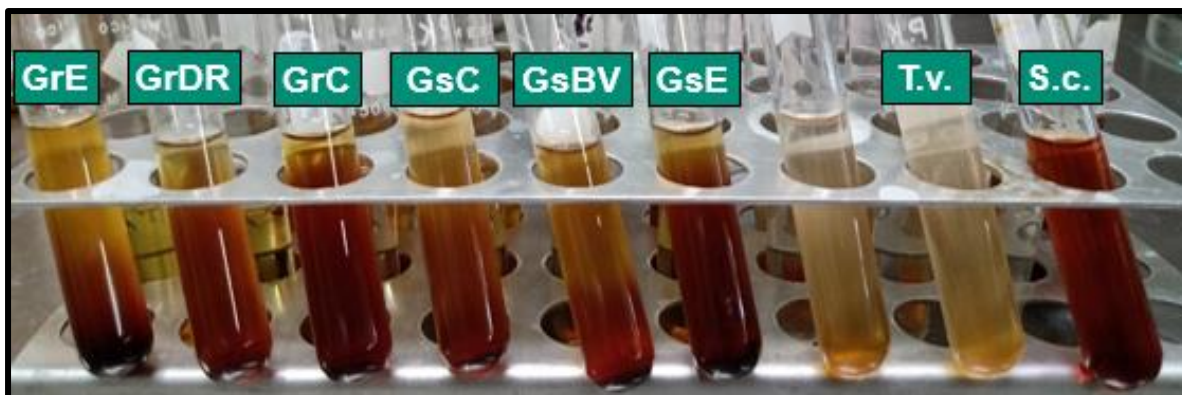
**GrDR**= *G. resinaceum/Delonix regia*. **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia*.  
**GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia*. **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata*.  
**GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **GM**= *Ganoderma sp.* **GsAM**= *G. sessile/árbol muerto*. **T.v**= *T. versicolor*. **S.c.**= *S. commune*

En la figura 18 se aprecia una placa TLC revelada con cloruro de antimonio para la identificación de glucósidos cardiotónicos, las manchas con  $R_f=0.62$  son positivas para estos compuestos.



**GAM**= *Ganoderma* sp. **GsAM**= *G. sessile*/árbol muerto. **T.v**= *T. versicolor*. **S.c.**= *S. commune*. **P1**= producto comercial 1. **P2**= Producto comercial 2.

**Figura 18.** TLC revelada con reactivo de Cloruro de antimonio



**GrDR**= *G. resinaceum*/*Delonix regia*. **GrC**= *G. resinaceum*/*Casuarina equisetifolia*. **GsC**= *G. sessile*/*Casuarina equisetifolia*. **GsBV**= *G. sessile*/*Bauhinia variegata*. **GsE**= *G. sessile*/*Eucalyptus* sp. **T.v**= *T. versicolor*. **S.c.** = *S. commune*.

**Figura 19.** Reacción de Keede para compuestos glucósidos.

Para confirmar la presencia de compuestos del tipo glucósido se llevó a cabo una prueba de Keede en tubo. La figura 19 muestra el resultado (la coloración rojizo/violeta se considera positivo para glucósidos cardiotónicos).

#### **7.6. TLC para identificación de cumarinas.**

Para los extractos GrE, GrDR, GrC, GsC, GsBV, GsE y T.v., se observó la presencia de cumarinas, es decir, manchas de color azul brillante con un  $R_f=0.20$ , al asperjar la placa TLC con KOH.

#### **7.7. Pruebas de identificación por formación de grupos cromogénicos.**

La tabla 19 muestra el tamizaje químico para los ensayos realizados mediante reacción de precipitación de metabolitos y la formación de grupos cromogénicos, esto para extractos etanólicos.



**Tabla 20.** Tamizaje de metabolitos contenidos en las muestras.

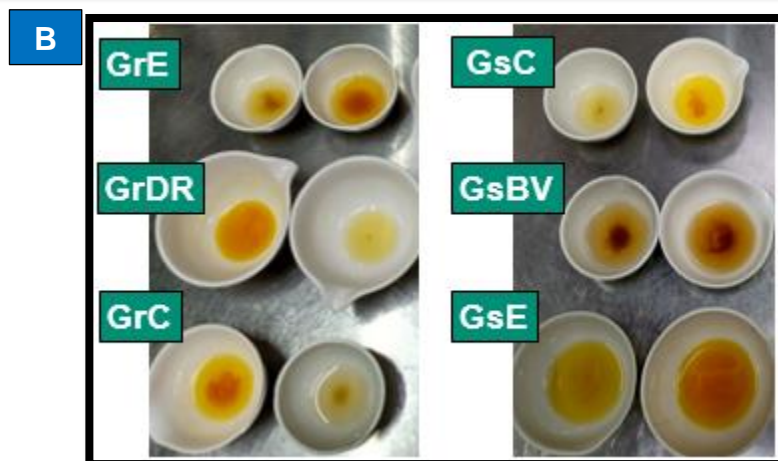
Muestra	Saponinas	Reactivo Kedde (Glucósidos cardiotónicos)	Reacción Shinoda (flavonoides)	FeCl <sub>3</sub> (taninos)	Alcaloides	Esteroides	Triterpenos
GrE	+	+	-	-	++	+	+
GrDR	+	++	-	-	+	+	+
GrC	++	+++	-	-	++	+	+
GsC	++	++	-	-	++	+	+
GsBV	+++	+	-	-	+++	+	+
GsE	++	+++	-	-	+	+	+
T.v.	++	-	-	-	+	+	+
S.c.	+++	+++	-	+	-	+	-

**GrDR**= *G. resinaceum/Delonix regia*. **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia*. **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia*. **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata*. **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **T.v**= *T. versicolor*. **S.c.** = *S. commune*. (-) Ausente, (+) Presente, (++) Abundante, (+++) Muy abundante.

El tamizaje químico destaca la presencia de alcaloides, saponinas y glucósidos cardiotónicos. Los extractos GrE, GrDR, GrC, GsC, GsBV, GsE, T.v., dieron positivo para alcaloides en las pruebas de precipitación Dragendorff y Meyer, las reacciones de precipitación de metabolitos no indicaron la presencia de compuestos taninos y flavonoides.

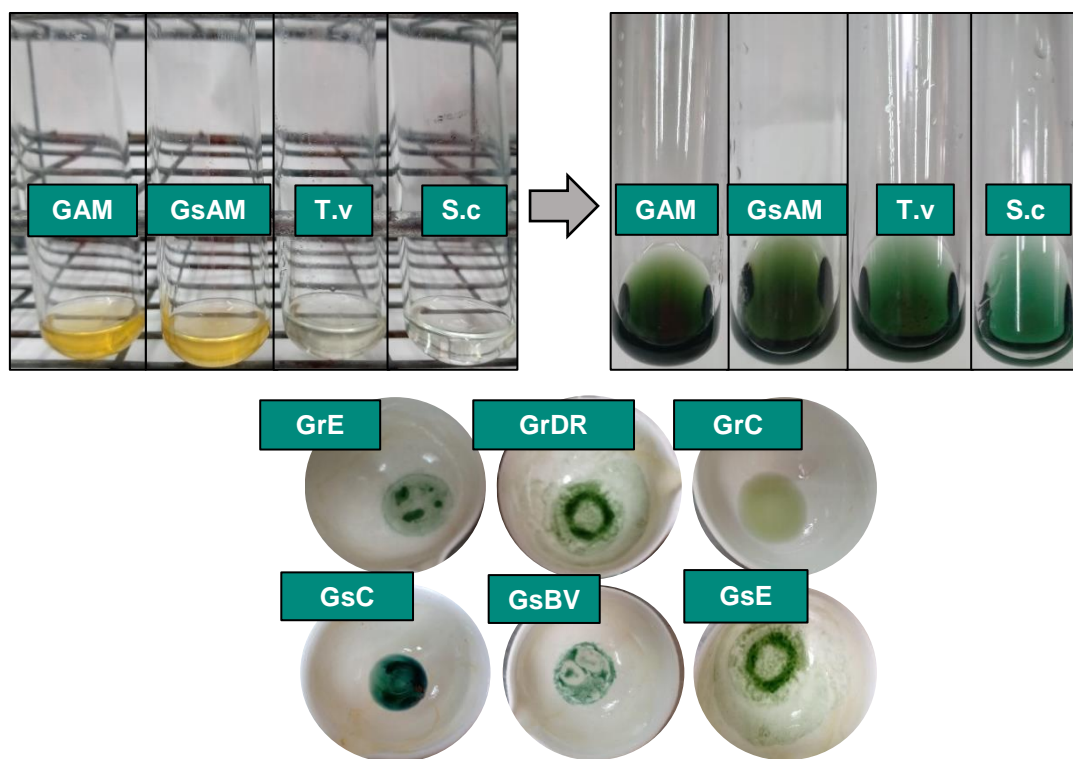
Para las especies *S. commune* y *T. versicolor*, se ha reportado en estudios fitoquímicos recientes (Manjusha, 2020) y similares a los presentados en este trabajo, positivo para la presencia de alcaloides, terpenoides, glucósidos y saponinas, esto en extractos metanólicos. En otro estudio fitoquímico similar (Harewati *et al.*, 2021) para extractos etanólicos, se ha reportado la presencia de

cumarinas, taninos, esteroides, flavonoides y la ausencia de saponinas, triterpenos y alcaloides para *S. commune*, y para *T. versicolor*, se identificó la presencia de cumarinas, taninos, saponinas, triterpenos y flavonoides, así como la ausencia de alcaloides y esteroides.



**GrE**= *G. resinaceum/Eucalyptus sp.* **GrDR**= *G. resinaceum/Delonix regia.* **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia.* **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia.* **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata.* **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **T.v**= *T. versicolor.* **S.c.**= *S. commune.*

**Figura 20. A)** Prueba rápida de saponinas. **B)** Prueba de precipitación de alcaloides.



**GrE**= *G. resinaceum/Eucalyptus* sp. **GrDR**= *G. resinaceum/Delonix regia*. **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia*. **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia*. **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata*. **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus* sp. **GAM**= *Ganoderma* sp. **GsAM**= *G. sessile/ arbol muerto*. **T.v**= *T. versicolor*. **S.c.** = *S. commune*.

**Figura 21.** Prueba en tubo para identificación de esteroides y triterpenos

La figura 21 ilustra el resultado de la prueba para identificación de esteroides y triterpenos, la reacción resultó en un cambio de color al agregar el ácido sulfúrico al lavado en cloroformo del extracto metanólico, dicho cambio de color fue del violeta rojizo al verde en el caso de todas las muestras del género *Ganoderma*, para la muestra T.v. la reacción fue del ligeramente rojizo al verde y en S.c. los colores fueron desde ligeramente violeta al azul verdoso.

En la tabla 21 se resume los principales metabolitos identificados en los extractos de hongos *G. resinaceum*, *G. sessile*, *T. versicolor*, *S. commune*. Se aprecian las similitudes y diferencias encontradas entre los ejemplares de la misma especie localizados en los diferentes sustratos.

Para los ejemplares de *G. sessile* y *G. resinaceum*, existen similitudes de metabolitos identificados: uno de características esteroidales ( $R_f=0.71$ ), otro de tipo glucósido ( $R_f=0.62$ ) y un tercero que pudiera corresponder a saponinas esteroidales ( $R_f=0.77$ ). Ambas especies, muestran también, diferencias entre metabolitos de características lactónica principalmente; las pruebas fitoquímicas señalan que los ejemplares colectados en *C. equisetifolia* presentan un menor número de estos compuestos.

Las diferencias en las características fitoquímicas entre ejemplares colectados sugieren que, los principales metabolitos identificados son propios de la especie, sin embargo, el sustrato del cual es colectado el hongo, puede ser un factor adicional en la variación de dichas propiedades fitoquímicas entre ejemplares de la misma especie.

**Tabla 21.** Resumen de metabolitos identificados en las muestras de hongos: *G. resinaceum*, *G. sessile*, *T. versicolor*, *S. commune*.

Especie	Sustrato	Esteroides	Lactonas	Glucósidos cardiotónicos	Triterpenos	Alcaloides	Saponinas
<i>G. resinaceum</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	+	+++++	+	+	++	+
	<i>Delonix Regia</i>	+	+++++	++	+	+	+
	<i>Casuarina equisetifolia</i>	+	++	+++	+	++	++
<i>G. sessile</i>	<i>Casuarina equisetifolia</i>	++	+++	++	+	++	++
	<i>Bauhinia variegata</i>	+	+++++	+	+	+++	+++
	<i>Eucalyptus sp</i>	+	+++++	+++	+	+	++
	árbol muerto	+++	-	+	+	N/D	N/D
<i>Ganoderma sp.</i>	árbol muerto	+++	+	+	+	N/D	N/D
<i>T. versicolor</i>	árbol muerto	++	+	+	+	+	++
<i>S. commune</i>	árbol muerto	++	-	+++	-	-	+++

(-) Ausente, (+) Presente, (++) Abundante, (+++) Muy abundante. N/D = No detectado. (+) Positivo solo en prueba TLC.

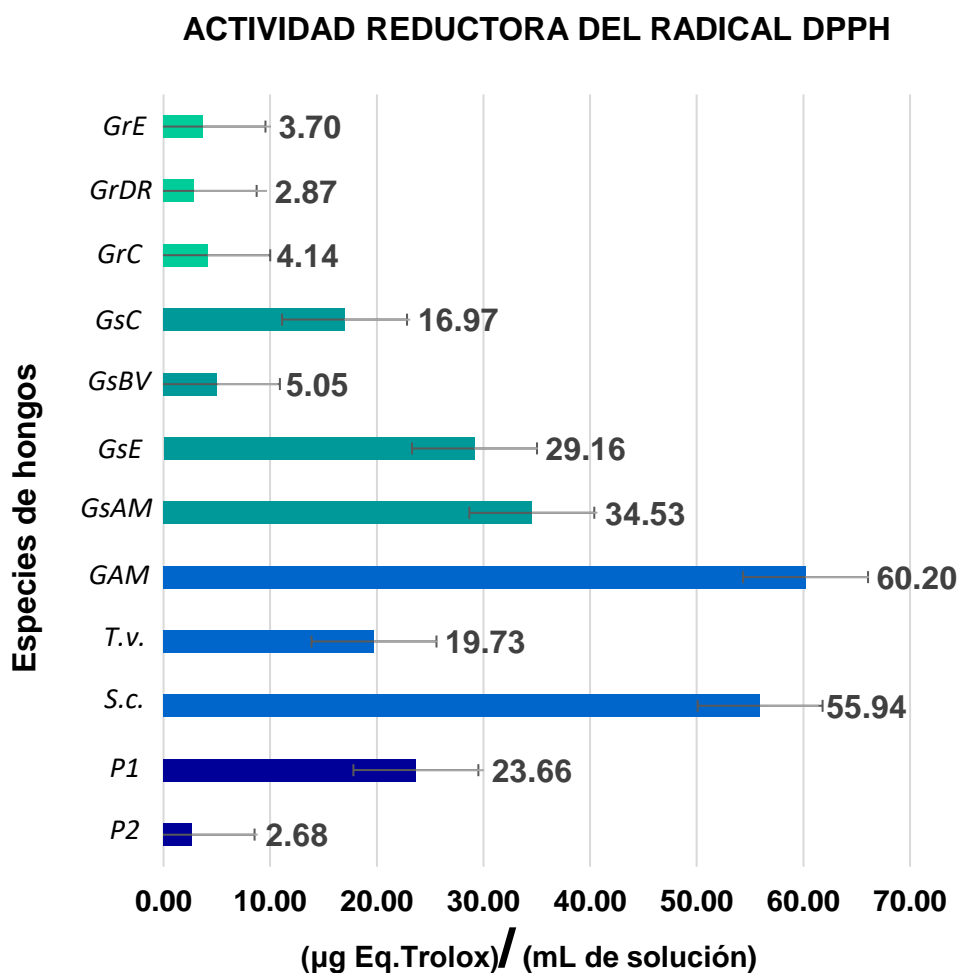
Los resultados del estudio preliminar fitoquímico concuerdan con lo presentado en algunos trabajos con otras especies de *Ganoderma*. (Shah *et al.*, 2014) reportaron para los extractos metanólicos de *G. lucidum*, tener la mayor cantidad y variedad de compuestos presentes comparado con otros extractos, identificaron compuestos glucósidos, triterpenos, esteroides, fenoles y taninos. Dora & Hena (2017) realizaron una evaluación fitoquímica de *G. lucidum* a partir de extractos metanólicos y fueron identificados metabolitos de tipo alcaloides, saponinas, glucósidos, triterpenos y flavonoides.

En *G. resinaceum*, algunos autores (Peng *et al.*, 2013), (Niu *et al.*, 2007) ya habrían reportado compuestos triterpenos con actividades terapéuticas anticancerígenas. (Chen y colaboradores (2018) reportaron también triterpenos contenidos en extractos etanólicos y evaluaron actividad inhibitoria de dichos metabolitos sobre  $\alpha$ -glucosidasa.

Así mismo compuestos esteroides, triterpénicos, alcaloides y cardenólidos han sido reportados para *T. versicolor* (Leliebre *et al.*, 2016). Por otro lado (Chaturvedi *et al.*, 2018) identificaron taninos, alcaloides y saponinas en el extracto etanólico de *S. commune*.

## 7.8. Actividad reductora del radical DPPH

La figura 14 señala los resultados de la prueba DPPH para todos los extractos metanólicos obtenidos de los ejemplares de hongos colectado en este estudio, así como de los dos productos comerciales de comparación.



**GrE**= *G. resinaceum/Eucalyptus sp.* **GrDR**= *G. resinaceum/Delonix regia.* **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia.* **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia.* **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata.* **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **GAM**= *Ganoderma sp.* **GsAM**= *G. sessile/árbol muerto.* **T.v.**= *T. versicolor.* **S.c.** = *S. commune.* **P1**= producto comercial 1. **P2**= Producto comercial 2.

**Figura 22.** Porcentaje de capacidad reductora del radical DPPH.

Los resultados de la prueba DPPH para medir capacidad antioxidante demuestran la diferencia que existe entre los extractos, GsE, GsAM, GAM, (29.16, 34.53, 60.20  $94 \frac{\mu g \text{ Eq.Trolox}}{\text{ml de sol.}}$ , respectivamente) que pertenecen a hongos de la misma especie, dichos extractos así como S.c., superan la capacidad antioxidante de los productos comerciales ( $55.94 \frac{\mu g \text{ Eq.Trolox}}{\text{ml de sol.}}$ ), P1 y P2 (23.66,  $2.68 \frac{\mu g \text{ Eq.Trolox}}{\text{ml de sol.}}$ , respectivamente)

En 2013, Jaejung-Lee y colaboradores, realizaron estudios sobre el potencial antioxidante de varias especies de basidiomicetos a partir del cultivo de micelio de los mismos, probaron extractos etanólicos del cultivo donde se evaluaba la capacidad de *S. commune* y *T. versicolor* en la actividad DPPH, siendo de 15% y 0 respectivamente.

En un estudio reciente (Majusha, 2020) determinaron de igual manera la capacidad de captura del radical DPPH de extractos metanólicos de algunas especies de hongos silvestres, entre ellas *S. commune* y *T. versicolor*, los resultados de dicho estudio fueron 11.27% y 18.30% respectivamente (en la menor concentración probada) comparadas con los de este estudio 55.9% (*S. commune*) y 19.7% (*T. versicolor*).



### 7.9. Determinación de polisacáridos ( $\beta$ -glucanos)

Un total de 11 muestras fueron procesadas con el kit de identificación de beta-glucanos, 7 de ellas del género Ganoderma (GrE, GrDR, GrC, GsC, GsBV, GsE), una de *T. versicolor* (T.v.), un producto con extracto comercial de *T. versicolor* y un producto con extracto comercial de *G. lucidum*, la tabla 22 muestra los resultados de realizar una identificación de  $\beta$ -glucanos con el kit.

**Tabla 22.** Porcentaje de polisacáridos por seco de muestra

Muestra	Absorbancia	B-Glucan
		% w/w
GrE	0.359	40.30
GrDR	0.032	0.35
GrC	0.033	0.37
GsC	0.110	3.45
GsBV	0.017	0.12
GsE	0.015	0.10
GsAM	0.013	0.12
T.v.	0.025	0.27
P1	0.036	0.47
P2	0.150	6.28

**GrDR**= *G. resinaceum/Delonix regia*. **GrC**= *G. resinaceum/Casuarina equisetifolia*. **GsC**= *G. sessile/Casuarina equisetifolia*. **GsBV**= *G. sessile/Bauhinia variegata*. **GsE**= *G. sessile/Eucalyptus sp.* **T.v**= *T. versicolor*. **P1**= producto comercial 1. **P2**= Producto comercial 2.

GrE demostró, según la prueba, tener un alto porcentaje de polisacáridos del tipo  $\beta$ -glucano, seguido de GsC. Existe una notable diferencia del contenido de b-glucanos

en las muestras, esto puede deberse a la naturaleza de las mismas, ya que su consistencia fibrosa hace difícil el manejo de ellas. Por otro lado, la identificación de  $\beta$ -glucanos mediante el kit utilizado, recurre a un método modificado cuya especificidad es alta para  $\beta$ -glucanos con enlaces del tipo (1-4) y (1-3) y no para enlaces tipo  $\beta$  (1-6), de tal manera que estos resultados deberán ser confirmados en futuras pruebas.

## VIII. CONCLUSIONES.

1) La descripción de las características de los ejemplares colectados a través de las claves taxonómicas, permitieron identificar las muestras como pertenecientes a *T. versicolor* y *S. commune*, las cuales fueron colectadas en Tapalpa y Mezcala respectivamente, de igual manera, la descripción de los ejemplares con las claves dicotómicas así como la comparativa de las esporas en el microscopio con lo reportado por otros autores, permitió identificar los ejemplares del género *Ganoderma* como *G. sessile* y *G. resinaceum*, las cuales pertenecen a un complejo de especies, sin embargo es necesario los trabajos moleculares correspondientes para la confirmación de lo anterior.

2) La evaluación fitoquímica demuestra que; las especies del género *Ganoderma* presentan similitudes en el contenido de metabolitos, con diferencias en la concentración, así como diversos tipos de un mismo metabolito. Los principales compuestos fitoquímicos identificados en el género *Ganoderma* fueron: de cuatro a cinco tipos de lactonas sesquiterpénicas, alcaloides, saponinas, esteroides (dos tipos en GAM), triterpenos y glucósidos cardiotónicos. En *T. versicolor* existe la presencia de esteroides, triterpenos y saponinas; en *S. commune* se encontraron esteroides, glucósidos cardiotónicos y saponinas, los cuales tienen similitudes con lo presente en *G. sessile* y *G. resinaceum*.

3) En la mayoría de las muestras del género *Ganoderma* se señala con el  $R_f=0.77$  un metabolito que posee una estructura química compleja la cual fue identificado como un glucósido del tipo cardiotónico el cuál, debido a la naturaleza del mismo, se

requieren métodos de identificación más completos para su determinación y valoración de su potencial uso terapéutico.

**4)** La valoración de la actividad antioxidante indica una diferencia notable entre los diferentes ejemplares colectados; *S. commune* y las muestras GsAM y GAM demostraron actividades antioxidantes de 55.9%, 34.5% y 60.2%, las cuales son superiores a los productos comerciales de comparación, P1 con 23.6% y P2 con 2.6%. En *T. versicolor* la actividad antioxidante fue de 19.7%, ligeramente inferior comparado con el resultado de P1 (producto comercial de extracto de *T. versicolor*).

**5)** La prueba de cuantificación de  $\beta$ -glucanos indicó que GrE posee por cada 100 g de materia seca un 40.3% de estos polisacáridos, muy superior comparado con todas las muestras analizadas incluidas los productos de comparación, seguido con el 3.4% de GsC, mientras que P1 obtuvo 0.4% y P2 6.2%. Estos resultados deben ser confirmados en pruebas futuras.

**6)** Los extractos analizados en este trabajo fueron comparados con productos comerciales que contienen extractos de hongos *G. lucidum* y *T. versicolor*, los resultados indican que: **a)** los extractos a partir de muestras colectadas poseen mayor concentración de metabolitos secundarios que los productos de comparación y, **b)** las características fitoquímicas son de mayor interés y complejidad en los extractos de muestras colectadas que en sus homólogos obtenidos de productos comerciales.

7) Los resultados indican que las especies colectadas pudieran ser consideradas como fuente de materia prima para la obtención de productos nutraceúticos y/o terapéuticos en el mercado, siempre que en trabajos futuros se confirme la nula o baja toxicidad que pudieran poseer.

## REFERENCIAS.

- Ahmad, A., Asad, S., Singh, S., & Hadi., S. (2000). , DNA breakage by resveratrol and Cu(II): Reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer Lett.*, 154, 29–37.
- Aída, D. I., Sonia, P. C., Mirta, L. C., & Galina, M. T. (2014). Determination of parameters chemist - physical of the dyes to 20 obtained% of the leaves, shafts and fruits of *Melia azedarach* L (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, versión On-line ISSN 1729-519X.
- Alfonso, R. d. (2006). *Química de la Flora Mezicana*. México, D.F.: Sociedad química de México.
- Amar, K., Manoj, K., & Sinha, M. P. (2019). Hepatoprotective efficacy of edible macrofungi *Dacryopinax spathularia* (Schwein) and *Schizophyllum commune* (Fries) against Carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino Wistar rats. *Applied and Natural Science Foundation*, Vol 11(1). doi.org/10.31018/jans.v11i1.1959.
- Amar, K., Manoj, K., Sarfaraz, A., Lal, S. B., & Sinha, M. (2019). Anti-pathogenic efficacy of Indian edible macrofungi *Dacryopinax spathularia* (Schwein) and *Schizophyllum commune* (Fries) against some human pathogenic bacteriae. *JETIR*, Vol. 6 Issue1. ISSN: 2349-5162.
- Andrejus, K., & Joseph, H. B. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica*. Barcelona, Esp.: Reverté.
- Andriy, S., Kateřina, M., Alla, S., Ivan, J., Jiří, S., Vladimír, E., . . . Jan, Č. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 548-556; doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021.

- Arbaayah, H. H., & Umi, K. (2013). Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere*, 661-673. doi: 10.5943/mycosphere/4/4/2.
- Arias, E. B. (2013). *Biomoléculas*. Salamanca, España: Ediciones Universidad de Salamanca.
- Bath, S. V., & Nagasampagi, B. A. (2005). *Chemistry of Natural Products*. Pune, India: Narosha Publishing House Pvt, Ltd. pp 15-17.
- Bellik, Y., L., B., Alzahrani H., A., Bakhotmah, B. A., F., A., Hammoudi, S. M., & and Iguer-Ouada, M. (2013). Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and Anti-allergic activities of phytochemicals: An update. *Molecules*, 18: 322-352.
- Béni, Z., Miklós, D., Bernadett, K., Boglárka, C.-L., Zoltán, P. Z., Erika, K., . . . Judit, H. &. (2018). Bioactivity-Guided Isolation of Antimicrobial and Antioxidant Metabolites from the Mushroom *Tapinella atrotomentosa*. *Molecules*, 3(5), 1082. doi:10.3390/molecules23051082 .
- Bilal, A.-W., Bodha, R. H., & Wani, A. H. (2010). Nutritional and Medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2598-2604. DOI: 10.5897/JMPR09.565 .
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Bugrahan, E., Aytac, K., Abdullah, K., Seval, C., Muhammad, A., & Gokhan, S. (2017). IN VITRO CYTOTOXICITY, ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF VARIOUS EXTRACTS FROM SCHIZOPHYLLUM COMMUNE FR. *Fresenius Environmental Bulletin*, 1144-1153.
- Cachinero, C. F., & Moreno, V. A. (2014). *Recolección de Hongos Silvestres*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. pp. 41-50.
- Cai, X., Yan, P., Xin, Z., Life, T., Shouyi, Q., & Juan, L. (2010). Hepatoma Cell Growth Inhibition by Inducing Apoptosis with Polysaccharide Isolated from Turkey Tail

- Medicinal Mushroom, *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. Vol 12, 257-263. 10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.40.
- Campbell, N. A., & Reece, J. (2005). Capítulo 31. Hongos. En N. A. Campbell, & J. & Reece, *Biología* (págs. 608-618). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Cano, E., & Romero, B. L. (2016). Valor Económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista Chilena de Nutrición*, 75-80.
- Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., & Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *Molecular Sciences*, 12780-12805.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional value*, (Segunda ed.). USA: CRC Press.
- Chaturvedi, V. C., Sonam, A., Krishna, K. G., & Pramod, W. R. (2018). Medicinal Mushroom: boon therapeutic applications. *3 Biotech*, 8(8). Doi:10.1007/s13205-018-1358-0.
- Ciria, V. O. (1995). *Fundamentos de fitoquímica*. Mexico, D.F.: Editorial Trillas.
- De García, C. M., Silvia, R. R., Franco-Molano, A. E., Cárdenas, T. M., & Estupiñan, V. N. (2012). *Biología de Hongos*. Bogotá: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas, Ediciones Uniandes.
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology, 4ta edición*. Malden, M.A., USA.: Blacwell Publishing.
- Domínguez, X. A. (1973). *Investigación fitoquímica*. México, D.F.: Grafica Panamericana.
- Eduardo, P. Y. (1996). *Química orgánica y aplicada. Vol 1*. Barcelona, España: Reverté.
- Erich, H. (1974). Functions of steroids in plants. *Phytochemistry*, 891-901.



- Etelvina, G., Laura, G.-D., Gastón, G., & Olivia, R. (2014). Inventario micobiótico de la región de tapalpa, Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana*, 165-185.
- Finimundy, T. T., Scola, G., Scariot, F. J., Dillon, A. J., Moura, S., Echeverrigary, S., . . . Ely, M.-R. (2018). Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Responses Induced by Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) Aqueous Extract against a Larynx Carcinoma Cell Line. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 31-46. 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025400.
- Francis, J. B. (2018). Chemistry of Sesquiterpene Lactones. En V. P. Sülsen, & V. S. Martino, *Sesquiterpenes Lactones* (págs. 93-95). Buenos Aires, Argentina: Springer International Publishing, AG.
- Francisco, D. D. (2011). *Hongos medicinales*. México. DF.: Ediciones Munfi-Presna. Cap. 1. pp 1-35.
- Gagliardi, L., Orsi, D. D., Giudice, M. R., Gatta, F., Porra, R., Chimenti, P., & Tonelli, D. (2002). Development of a tandem thin-layer-chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products. *Analytica Chimica Acta*, 187-195.
- Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.*, 37(3), 287–303.
- Griffin, D. H. (1994). *Fungal Physiology* (Segunda ed.). New York: WILEY-LISS. pp 55-57.
- Guillermo, C. O., Diana, Z. C., & Maria, L. C. (2017). Análisis fitoquímico: Una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Tlatemoani (Revista Académica de Investigación)*, 16 (71-86).
- Guzmán, G. (1990). *Identificación de los Hongos (Comestibles, venenosos, alucinantes)*. México, D.F.: Limusa.

- Hadi, S., Asad, S., Singh, S., & Ahmad, A. (2000). Putative mechanism for anticancer and apoptosis inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* 50, 167–171.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys*, 476(2):107-12. doi: 10.1016/j.abb.2008.01.028.
- Han, B., Baruah, K., Cox, E., Vanrompay, D., & Bossier, P. (2020). Structure-Functional Activity Relationship of beta-Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review. *Frontiers in Immunology*, Vol 11, (8) 658; doi:10.3389/fimmu.2020.00.
- Heinz, L., & Klaus Mohr, L. H. (2010). *Farmacología: texto y atlas*. España: Editorial médica panamericana.
- Herewati, E., Rico, R., Farida, A., Marjenha, Irawan Wijaya, K., Wiwin, S., . . . Enos, T. A. (2021). Phytochemical screening and antioxidant activity of wild mushrooms growing in tropical regions. *Biodiversitas*. Vol. 22, 4716-4721.
- Hirui, H., JiaCheng, F., Xiaoxiao, W., & Yu, C. (2017 vol. 97). Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Herichium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. *International journal of biological macromolecules*, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.040.
- Irshad, M., & Chaudhuri, P. (2002). Oxidant-Antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J. Exp. Biol.*, 40: 1233-1239.
- Iwashina, T. (2013). Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.* 39, 25-51.
- Jaejung-Lee, Joo-Hyun, H., Jeong-Do, K., Byoung, J. A., Beom, S. K., Gyu-Hyeok, K., & Jae-Jin, K. (2013). The antioxidant properties of solid-culture extracts of basidiomycetous fungi. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 59, 279–285.
- Jang, H.-J., Ji-Eun, K., Kyoung, H. J., Sung, C. L., Seong, Y. K., & Kyung-Ok, C. (2019). The Neuroprotective Effect of *Herichium erinaceus* Extracts in Mouse

- Hippocampus after Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *International Journal of Molecular Science*, 20(4), 859. doi:10.3390/ijms20040859 .
- Jin, Y., Li, P., & Wang, F. (2018).  $\beta$ -glucans as potential immunoadjuvants: A review on the adjuvanticity, structure-activity relationship and receptor recognition properties. *Vaccine*, doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.038.
- Khoo, H., Azlan, A., Tang, S., & Lim, S. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* 61(1), 1361779.
- Kim, D. P. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante y el efecto antiinflamatorio de los extractos de agua de *Heridium erinaceus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 21 (2), 112-117. <https://doi.org/10.7783/kjmcs.2013.21.2.112>.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., & Saito, G. (1969). Host-mediated antitumor action of Schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gan*, 60, 137-44.
- Lee, J., Hong, J.-H., Kim, J.-D., Ahn, B. J., Kim, B. S., Kim, G. H., & Kim, J.-J. (2013). The Antioxidant properties of culture-solid extracts of *Basidiomycetous fugi*. *Journal Gen. Appl. Microbiol*, 279-285.
- Lee, M. T. (2011). Ergosta 7,22-diene-2B, 3a, 9a-triol from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* induces apoptosis in human myelocytic HL-60 cells. *Phytotherapy Research*, doi: 10.1002/ptr.3447.
- Leliebre, L. V., Monzote Fidalgo, L., Pferschy-Wenzig, E., M., Kunert, O., Nogueiras Lima, C., & Bauer, R. (2016). In Vitro Antileishmanial Activity of Sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). *Molecules*, 21(8), 1045. doi:10.3390/molecules21081045 .
- Leyva, J. M., Pérez-Carlón, J., Gonzáles-Aguilar, G., Esqueda, M., & Ayala-Zavala, J. (2013). Funcionalidad Antibacteriana y Antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrilli*. *REVISTA MEXCIANA DE MICOLOGÍA*, 11-17.

- Lin, Z., Yum-Shing, W., Mumin, S., Shiyong, H., Fochang, W., & Jianping, C. (2018). Apoptosis induced by 9,11-dehydroergosterol peroxide from *Ganoderma Lucidum* mycelium in human malignant melanoma cells is Mcl-1 dependent. *Molecular Medicine Reports*, 938-944. 10.3892/mmr.2018.9035.
- Loyd, A. L., Barnes, C. W., Held, B. W., Schink, M. J., Smith, M. E., Smith, J. A., & Blanchette, R. A. (2018). Elucidating "lucidum": Distinguishing the diverse laccate *Ganoderma* species of the United States. *PLOS ONE*, 01-31.
- Madhumita, R., & Amitava, D. (2019). Fundamentals of Phytochemicals. In: *Cancer Genetics and Therapeutics*. En R. Madhumita, & D. Amitava, *Cancer Genetics and Therapeutics* (págs. 49-50). Singapore: Springer, DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9471-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9471-3_3).
- Majusha, P. (2020). Molecular Identification and Isolation of Antimicrobial, Phytochemical, Antioxidant Properties of Different Solvent Extracts from Wild Mushrooms. *Saudi Journal of Pathology and Microbiology*, 98-107 10.36348/sjpm.2020.v05i02.011.
- Martino, V. S., & Sülsen, V. P. (2019). Lactonas sesquiterpénicas: promisorio grupo de compuestos bioactivos. *Rev. Farm. Vol 161*, 24-37.
- Mena, V. L., Tamargo, S. B., Salas Olivet, E., Plaza, P., Luis, E., Blanco, H., . . . Anselmo, & S. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 106-116.
- Meneses, M. E., Daniel, M.-C., Nimbe, T., Mónica, S.-T., Miriam, A.-L., Porfirio, M., . . . Armando, R. T. (2016). Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice. *PLOS One*, 11(7). [doi.org/10.1371/journal.pone.0159631](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159631).
- Mengzhu, Z., Ruotian, T., Yue, D., Kaiying, Y., & Lixia, C. & (2018). Steroids from *Ganoderma sinense* as a new natural inhibitors of cancer associated mutant IDH1. *Bioorganic Chemistry*, 79, 89–97. doi:10.1016/j.bioorg.2018.04.016.

- Michael, D., Richard, H., Chuanlin, D., Daniel, E. C., & Jun, Y. (2009). Therapeutic potential of various beta-glucan sources in conjunction with anti-tumor monoclonal antibody in cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, 8(3):218-25. doi: 10.4161/cbt.8.3.7337.
- Milay, C.-H., Alma Rosa, V.-A., Mabel Gisela, T.-T., Cony, D., & Laura, G.-D. (2019). The *Ganoderma weberianum-resinaceum* lineage: multilocus phylogenetic analysis and morphology confirm *G. mexicanum* and *G. parvulum* in the Neotropics. *MycoKeys* 59, 95:131.
- Milena, R., Popović, M., Knežević, P., Šibul, F., Kaišarević, S., & Karaman., M. (2020). Bioactive Phenolic Compounds of Two Medicinal Mushroom Species *Trametes versicolor* and *Stereum subtomentosum* as Antioxidant and Antiproliferative Agents. *Chemistry & Biodiversity*, 1-30. doi.org/10.1002/cbdv.202000683.
- Moreno, H., & Martínez, A. &. (2010). Aislamiento e Identificación de dos esteroides y un triterpenoide del cuerpo Fructífero de *Ganoderma lucidum*, Cultivado en Colombia. *Revista de la Facultad de química farmacéutica*, 11-15.
- Nicholas, P. M. (2016). Are mushrooms medicinal? *Fungal Biology*, 120(4), 449–453.
- Niu, X.-M., Li, S.-H., Xiao, W.-L., Sun, H.-D., & Che, C.-T. (2007). Two new lanostanoids from *Ganoderma resinaceum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 659-664.
- Njeru, S., Matasyoh, J., Charles, G., Mwendia, M., & Kobia, G. (2013). A review of some phytochemicals commonly found in medicinal plants. *Int J Med. Plants. Photon* 105, 135-140.
- Ogunwenmo, K., Idowu, O., Innocent, C., Esan, E., & Oyelana, O. (2007). Cultivars of *Codiaeum variegatum* (L.) Blume (Euphorbiaceae) show variability in phytochemical and cytological characteristics. *J. Biotechnol.* 20, 2400–2405 .
- Oliveros, C.-V. (2016). Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una

especie de *Pleurotus* y su uso potencial en un alimento de tipo funcional. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia.

- Panchawat, S., Rathore, K., & Sisodia, S. (2010). A REVIEW ON HERBAL ANTIOXIDANTS. *International Journal of PharmTech Research*, Vol.2, No.1, pp 232-239.
- Paritala, V., Chiruvella, K., Ripain, I., & Mohammed, A. (2014). A recent review on phytochemical constituents and medicinal properties of kesum (*Polygonum minus* Huds.). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 4(6), 430–435.
- Picman, A. K., Ranieri, R., Towers, G. H., & Jorge, L. (1980). Visualization reagents for Sesquiterpene Lactones and Polyacetylenes on Thin-Layer Chromatograms. *Journal of Chromatography*, 187-198.
- Placido, R.-F., Edgar, C.-E., Rocio, O.-B., Ricardo, V.-G., Vanessa, B.-V., Margarita, & Franco-Colin. (2015). Efecto hepatoprotector del micelio de *Trametes versicolor* en un modelo de ratón de la cepa NIH. *Rev. mex. cienc. farm vol.46 no.1*, 56-63.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K., & Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review . *INTERNATIONALE PHARMACEUTICA SCIENCIA*, 9 (98-106).
- Qiang, W., Xiaojing, S., Aimin, S., Hui, H., Ying, Y., Li, L., . . . Hongzhi, L. (2017).  $\beta$ -Glucans: Relationships between Modification, Conformation and Functional Activities. *Molecules*, 22(2): 257. doi:10.3390/molecules22.
- Rahman, A., Hadi, S. S., & Parish, J. ((1990)). Complexes involving quercetin, DNA and Cu(II). *Carcinogenesis* 11, 2001-2003.
- Raluca, P., Puia, I. C., Puia, A., Chedea, V. S., Leopold, N., Bocsan, I. C., & Buzoianu, A. D. (2018). Characterization of *Trametes versicolor*: Medicinal Mushroom with Important Health Benefits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 343-349.

- Robaszkiewicz, A., Bartosz, G., Lawrynowicz, M., & Soszynski, M. (2010). The role of polyphenols,  $\beta$ -carotene, and lycopene in the antioxidative action of the extracts of dried, edible mushrooms. *J Nutr Metab*, 1-9.
- Rodríguez, A. O., Figueroa, G., & Fonseca-Herrea, M. d. (2019). Catálogo de los Hongos de San Sebastián del Oeste, Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana*, ISSN 2448-7589. dx.doi.org/10.21829/abm126.2019.1364 .
- Roopalatha, U. C., & Vijay, M. (2013). PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF SUCCESSIVE REEXTRACTS OF THE LEAVES OF MORINGA OLEIFERA LAM. *International Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 629-634.
- Roy, M., Chakraborty, S., Siddiqi, M., & Bhattacharya, R. (2002). Induction of apoptosis in tumor cells by natural phenolic compounds. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 3, 61-67.
- Roy, M., Chakraborty, S., Sinha, D., Kundu, T., Bhattacharya, R., & Siddiqi., M. (2003). Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol. *Mutat. Res.*, 523–524, 33–41.
- Rubel, R., Dalla, S. H., Dos Santos, L. F., Fernandes, L. C., Figueredo, B. C., & Carlos, R. S. (2018). Immunomodulatory and Antitumoral Properties of *Ganoderma lucidum* and *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes) Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 393-403. 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025979.
- Russell, J. M., Stephen, T. L., Dale, R. G., Kip, E. P., & Lynn, F. J. (2007). Phytochemicals: The good, the bad and the ugly? *Phytochemistry*, 68(22-24), 2973–2985. doi:10.1016/j.phytochem.2007.09.004.
- Sado, R., Gimbo, R., & Salles, F. (2016). Routes of  $\beta$ -glucan administration affect hematological and immune responses of *Oreochromis niloticus*. *Archivos de Zootecnia*, 519-524.

- Saltarelli, R., Ceccaroli, P., & Iotti, M. (2009). Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chem*, 143-151. doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.023.
- Sárközy, A., Bení, Z. M., Zoltán, P., Kinga, R., Viktor, K., & Judith, H. &. (2020). Cerebrosides and Steroids from the Edible Mushrooms *Meripilus giganteus* with Antioxidant Potential. *Molecules*, 25(6), 1395. doi:10.3390/molecules25061395.
- Scarpari, M., A., P., Zaccaria, M., L., F., C., B., A., A. F., . . . C., F. (2015). Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. *Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, 150(4), 653–659. doi:10.1080/11263504.2014.981235 .
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: CYTED.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828–835. doi:10.1016/j.jopr.2013.10.001 .
- Srisailam, K., Kanakam, V., & Gowrishankar, N. L. (2017). ANTIOXIDANT ACTIVITY BY DPPH RADICAL SCAVENGING METHOD OF METHANOLIC EXTRACT OF n-BUTANOL FRACTION OF TRIBULUS TERRESTRIS LINN. (FAMILY ZYGOPHYLLACEAE). *International Journal of Pharmacognosy*, 4 (4): 127130.
- Suárez, C. A., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la. *Revista Iberoamericana*, 30(1) 1-8.
- Torres-Torres, M. G., L., R., & Guzman-Davalos, L. (2015). *Ganoderma* subgenus *Ganoderma* in Mexico. *Revista Mexicana de Micología*, 27-45.
- Turfan, N., Pekşen, A., Kibar, B., & Ünal, S. (2018). Determination of nutritional and bioactive properties in some selected wild growing and cultivated mushrooms from Turkey. *Acta Sci Pol Hortoru*, 17(3):57-72.



- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, doi: 10.1155/2015/376387.
- Vamanu, E., & Nita, S. (2013). Antioxidant capacity and the correlation with major phenolic compounds, anthocyanin, and tocopherol content in various extracts from the wild edible *Boletus edulis* mushroom. *BioMed Res Int*, 1-11.
- Varghese, R., Dalvi, Y., Lamrood, P., Shinde, B., & Nair, C. (2019). Historical and current perspectives on therapeutic potential of higher basidiomycetes: an overview. *3 Biotech*, (10):362. doi: 10.1007/s13205-019-1886-2.
- Vaz, J. A., Sanfrina, A. E., Anabela, M., Gabriela, M. A., M., H. V., & Isabel, C. F. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 2881-2884.
- Velavan, S., Nagulendran, K., & Mahesh, R. (2007). "In vitro antioxidant activity of *Asparagus racemosus* root". *Pharmacog Mag.*, 3, pp.26-33.
- Vivian, L. L., & Clara, N. L. (2019). Composición química del hongo basidiomiceto cubano, *Trametes versicolor*. *Repositorio Dspace*, 11-20.
- Vivian, L.-L. &. (20019). Composición Química del Hongo Basidiomiceto Cubano. *Acta Botánica Cubana*, 11-20.
- Wanger, H., Bladt, S., & Zgainski, E. (1984). *Plant Drugs Analysis. A thin layer chromatography atlas*. New York: Springer-Verlag.
- Wasser, S. (2010). Medicinal mushrooms Science: History, current status, future trends and unsolved problems. *Interational Journal of Medicinal Mushrooms*, 1-16.
- Wei, L., Sung, H. B., Changyeol, L., Jin, Y. M., Sang, H. S., & Young, H. K. (2017). Sterols, aromatic compounds, and cerebrosides from the *Hericium erinaceus* fruiting body. *Biochemical Systematics and Ecology*, 254–259. doi:10.1016/j.bse.2016.12.011.

- Yifan, G., Arshad Ahmed, P., Jia, W., Wei, Z., Mintao, Z., Ben, L., . . . Min, H. (2018). Recombinant latcripin 11 of *Lentinula edodes* C91-3 suppresses the proliferation of various cancer cells. *Gene*, 212-219.
- Ying, C., Lei, D., Dong, W., Fangwei, L., Laiyu, S., Cuiying, L., . . . Jie, C. (2013). 1,3- $\beta$ -Glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 708-712; doi.org/10.3892/mmr.2013.1553.
- Yoneda, K., Ueta, E., Yamamoto, T., & Osaki, T. (1991). Immunoregulatory effects of Sizofiran (SPG) on lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes. . *Clin. exp. Immunol.*, 86(2) 229–235; doi:10.1111/j.1365-2249.1991.tb05801.x .
- Zheng, X., Siwei, Z., Hui, X., Qingye, L., Jianhui, S., Min, X., . . . Lina, Z. (2016). The linear structure of  $\beta$ -glucan from baker's yeast and its activation of macrophage-like RAW264.7 cells. *Carbohydr Polym*, 148:61-8. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.044.
- Ziberna, L., M., L., M., S., V., A., T., F., P., S., & D., G. (2010). Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia–reperfusion injury: Beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc. Toxicol.*, 10, 283–294.
- Zou, C.-X., Xiao-Bo, W., Tiang, M. L., Zi-Lin, H., Bin, L., & Xiao-Xiao, H. &.-J. (2020). Flavan Derivative enantiomers and drimane sesquiterpene lactones from the *Inonotus obliquus* with neuroprotective effects. *Bioorganic Chemistry*, doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103588.