



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

## **DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

### **POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**Actividad biológica de extractos de basidiomas de  
cepas de *Ganoderma* spp. nativas de Sonora**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**ALEXANDER BACALLAO ESCUDERO**

**DIRECTOR: Dr. RAMÓN ENRIQUE ROBLES ZEPEDA**

**CO-DIRECTOR: Dra. PATRICIA GUERRERO GERMÁN**

**Hermosillo, Sonora**

**diciembre, 2021**

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

OFICIO DE APROBACIÓN DEL JURADO

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

**Alexander Bacallao Escudero**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

02-dic-2021

Fecha



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda  
Presidente

02-dic-2021

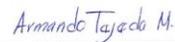
Fecha



Dra. Patricia Guerrero Germán  
Secretario

Dic 03, 2021

Fecha



Dr. Armando Tejeda Mansir  
Vocal

03-Dic-2021

Fecha



Dr. Martín Esqueda Valle  
Sinodal Externo

## OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE EXAMEN DE GRADO



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

### UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

#### AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

06 de Diciembre de 2021

Por medio de la presente se hace constar que el estudiante **ALEXANDER BACALLAO ESCUDERO**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

*Abraham Rogelio Martín García*  
DR. ABRAHAM ROGELIO MÁRTIN GARCÍA

COORDINADOR DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA:  
INGENIERÍA QUÍMICA

## RESUMEN

El cáncer continúa siendo una de las enfermedades más agresivas a nivel mundial, generando un alto número de defunciones anuales. Los hongos del género *Ganoderma* se caracterizan por producir una diversidad de metabolitos secundarios como triterpenoides, polisacáridos, flavonoides y fenoles con numerosas actividades biológicas entre las que se encuentran antiproliferativa, antioxidantes, antiinflamatorias y antibacterianas. El género se distribuye en Sonora y estudios previos demostraron la actividad antiproliferativa de extractos etanólicos aislados de *Ganoderma subincrustatum* y *G. weberianum* de Sonora sobre las líneas celulares HeLa, Raw 264.7, A549 y L-929. En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa por el ensayo de MTT sobre líneas celulares cancerosas como MDA, HeLa, A549 y Arpe-19; antiinflamatoria mediante la cuantificación de la producción de óxido nítrico (ON); antioxidante por las técnicas DPPH, ABTS y FRAP; antibacteriana por el método de microdilución en caldo sobre cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; de extractos etanólicos de basidiomas de *G. oerstedii*, *G. subincrustatum*, *G. weberianum* y *G. lucidum*. Los extractos mostraron actividad antiproliferativa con  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  sobre las líneas celulares de cáncer MDA, A549 y HeLa con excepción del extracto de *G. subincrustatum* con un  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ , la línea celular de control Arpe-19 se vio muy afectada, por lo que la actividad antiproliferativa no fue selectiva en las líneas celulares cancerosas. Estos mostraron inhibición significativa en la liberación de ON en células estimulada por LPS, hasta un 60% con los tratamientos de extractos *G. subincrustatum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum*, mientras *G. weberianum* redujo en un 47%. Se observó un moderado potencial antioxidante, por los ensayos DPPH y ABTS con  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ , aunque el extracto de *G. subincrustatum* presentó un  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  por el método DPPH; además se encontró una correlación significativa  $r > 0.5$  entre la actividad antioxidante obtenidos por DPPH, ABTS y FRAP con el contenido de fenoles y flavonoides totales. La actividad antibacteriana fue débil frente *Staphylococcus aureus* detectándose un  $MIC_{50} > 10 \text{ mg/mL}$ . Estos resultados demuestran que las especies de

*Ganoderma* de Sonora son una fuente potencial para obtener biomoléculas con actividad biológica.

## ABSTRACT

Cancer continues to be one of the most aggressive diseases worldwide, generating a high number of deaths annually. Fungi of the genus *Ganoderma* are characterized by producing a diversity of secondary metabolites such as triterpenoids, polysaccharides, flavonoids and phenols with numerous biological activities among which are antiproliferative, antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial. The genus is distributed in Sonora and previous studies demonstrated the antiproliferative activity of ethanolic extracts isolated from *Ganoderma subincrustatum* and *G. weberianum* from Sonora on HeLa, Raw 264.7, A549 and L-929 cell lines. In this work, the antiproliferative activity was evaluated by the MTT assay on cancer cell lines such as MDA, HeLa, A549 and Arpe-19; anti-inflammatory by quantifying nitric oxide (NO) production; antioxidant by DPPH, ABTS and FRAP techniques; antibacterial by the broth microdilution method on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cultures; of ethanolic extracts of basidiomes of *G. oerstedii*, *G. subincrustatum*, *G. weberianum* and *G. lucidum*. The extracts showed antiproliferative activity with  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  on the cancer cell lines MDA, A549 and HeLa with the exception of the *G. subincrustatum* extract with an  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ , the control cell line Arpe-19 was greatly affected, so the antiproliferative activity was not selective in cancer cell lines. These showed significant inhibition in the release of NO in cells stimulated by LPS, up to 60% with the treatments of extracts *G. subincrustatum*, *G. oerstedii* and *G. lucidum*, while *G. weberianum* reduced by 47%. A moderate antioxidant potential was observed, by the DPPH and ABTS tests with  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ , although the *G. subincrustatum* extract presented an  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  by the DPPH method; Furthermore, a significant correlation  $r > 0.5$  was found between the antioxidant activity obtained by DPPH, ABTS and FRAP with the content of phenols and total flavonoids. Antibacterial activity was weak against *Staphylococcus aureus* detecting a  $MIC_{50} > 10 \text{ mg/mL}$ . These results demonstrate that *Ganoderma* species from Sonora are a potential source for obtaining biomolecules with biological activity.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	V
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS .....	XII
NOMENCLATURA .....	XIII
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	1
Introducción .....	1
1.1.    Objetivo General .....	3
1.2.    Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO 2.....	4
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2.1.    El Cáncer.....	4
2.1.1.    Estadísticas.....	4
2.1.2.    La inflamación .....	5
2.1.3.    Radicales libres.....	6

2.1.4.	Los productos naturales como alternativa para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.....	7
<b>2.2.</b>	<b>El Reino Fungi .....</b>	<b>8</b>
2.2.1.	Familia Ganodermataceae .....	9
2.2.2.	Género Ganoderma .....	10
2.2.3.	<i>Ganoderma</i> en Sonora, México .....	10
<b>2.3.</b>	<b>Metabolitos secundarios de <i>Ganoderma</i> .....</b>	<b>14</b>
2.3.1.	Triterpenoides.....	14
2.3.2.	Polisacáridos .....	16
2.3.3.	Otros compuestos.....	17
<b>2.4.</b>	<b>Actividad biológica de <i>Ganoderma</i> .....</b>	<b>18</b>
2.4.1.	Anticancerígena .....	18
2.4.2.	Antiinflamatoria .....	19
2.4.3.	Antioxidante.....	19
2.4.4.	Antibacteriana.....	20
<b>CAPÍTULO 3.....</b>		<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>21</b>
<b>3.1.</b>	<b>Material biológico.....</b>	<b>21</b>
3.1.1.	Basidiomas de <i>Ganoderma</i> .....	21
3.1.2.	Cultivo celular .....	21
3.1.3.	Cultivo bacteriano.....	22
<b>3.2.</b>	<b>Obtención de los extractos etanólicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.</b>	<b>Actividad antiproliferativa .....</b>	<b>23</b>

<b>3.4. Actividad antiinflamatoria.....</b>	<b>24</b>
3.4.1. Evaluación de la producción de ON .....	24
<b>3.5. Actividad antioxidante .....</b>	<b>24</b>
3.5.1. Ensayo DPPH .....	24
3.5.2. Ensayo ABTS.....	25
3.5.3. Ensayo FRAP.....	25
<b>3.6. Actividad antibacteriana .....</b>	<b>26</b>
3.6.1. Método de microdilución en caldo .....	26
<b>3.7. Compuestos fenólicos .....</b>	<b>27</b>
3.7.1. Contenido de Fenoles Totales.....	27
3.7.2. Contenido de Flavonoides Totales.....	27
<b>3.8. Análisis Estadísticos .....</b>	<b>27</b>
 <b>CAPÍTULO 4.....</b>	 <b>28</b>
 <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	 <b>28</b>
<b>4.1. Obtención de los extractos etanólicos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Actividad antiproliferativa .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3. Evaluación de la producción de ON.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Actividad antioxidante .....</b>	<b>38</b>
<b>4.5. Actividad antibacteriana .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6. Compuestos Fenólicos.....</b>	<b>45</b>
 <b>CAPÍTULO 5.....</b>	 <b>49</b>

<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>49</b>
5.1. Conclusiones.....	49
5.2. Recomendaciones.....	50
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>66</b>
Anexo A: Resultados de las mediciones del diseño 4x2 de extracción etanólica. ....	66
Anexo B: Morfología línea celulares: .....	67
Anexo C: Ajuste del modelo farmacodinámico a los datos experimentales: a) Ensayo DPPH y b) Ensayo ABTS. ....	81
Anexo D: Correlación entre compuestos fenólicos y la actividad antioxidante .....	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Ganoderma oerstedii</i> : A) basidioma, B) contexto, C) cutícula. (López <i>et al.</i> , 2016).....	11
<b>Figura 2.</b> <i>Ganoderma weberianum</i> : A) basidioma, B) contexto, C) cutícula, D) basidiosporas. (López <i>et al.</i> , 2016).....	12
<b>Figura 3.</b> <i>Ganoderma subincrustatum</i> : A) basidioma, B) contexto, C) cutícula, D) basidiosporas. (López <i>et al.</i> , 2019).....	14
<b>Figura 4.</b> Esqueletos básicos de algunos triterpenoides aislados de <i>Ganoderma</i> . A) Ergostano, B) Lanostano. (Mora, 2010).....	15
<b>Figura 5.</b> Estructura de los $\beta$ -D-glucanos aislado de <i>G. lucidum</i> A) Diagrama molecular primario, B) Diagrama molecular de nivel superior. (Sanodiya <i>et al.</i> , 2009).....	17
<b>Figura 6.</b> Gráficos de contorno en parámetros de X1 y X2 decodificados en relacion masa/solvente y tiempo: a) 1/40 y 13 días; b) 1/40 y 15 días; c) 1/50 y 20 días.....	30
<b>Figura 7.</b> Perfil de interacciones de las variables en estudio: masa/solvente (X1), tiempo (X2) y porcentaje de extracción (Y). .....	31
<b>Figura 8.</b> Diagramas de los IC <sub>50</sub> de los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> : a) línea celular MDA, b) A549, c) Hela y d) Arpe-19. Tratamiento no indicados con la misma letra son significativamente distintos. ....	33
<b>Figura 9.</b> Morfología línea celular Hela, 24 h de aplicado el tratamiento: a) Control; b) Extracto <i>G. weberianum</i> (200 $\mu$ g/mL), Aumento (20X); c) Extracto <i>G. weberianum</i> (200 $\mu$ g/mL), Aumento (40X). ....	34
<b>Figura 10.</b> Efecto citotóxico de los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> sobre la línea Celular RAW 264.7.....	37
<b>Figura 11.</b> Efecto de los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> sobre la producción de óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7 activadas con LPS. ....	38
<b>Figura 12.</b> Gráficos de barra de los IC <sub>50</sub> de los extractos etanólicos de las especies de <i>Ganoderma</i> : a) DPPH y b) ABTS. Tratamientos no conectados por la misma letra son significativamente distintos.....	39
<b>Figura 13.</b> Curvas del estándar Trolox: a) DPPH, b) ABTS y c) FRAP.....	41

<b>Figura 14.</b> Capacidad antioxidante expresada en equivalentes de Trolox: a) Ensayo DPPH, b) Ensayo ABTS y C) Ensayo FRAP. Tratamientos no indicados con la misma letra son significativamente distintos .....	42
<b>Figura 15.</b> Correlación entre los equivalentes Trolox de los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> para los ensayos DPPH, ABTS y FRAP. ....	43
<b>Figura 16.</b> Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> ante <i>Staphylococcus aureus</i> : a) Efecto de los extractos sobre la viabilidad, b) Diagrama de barra de los extractos en la concentración más alta evaluada. ....	44
<b>Figura 17.</b> Curva de los estándares: a) ácido gálico para fenoles totales $R^2=0.98$ , b) quercetina para flavonoides totales $R^2=0.99$ . ....	45
<b>Figura 18.</b> Diagrama de barra de los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> : a) Fenoles totales, b) Flavonoides totales.....	47
<b>Figura 19.</b> Correlación entre fenoles y flavonoides totales.....	48

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Triterpenoides aislados de especies de <i>Ganoderma</i> .....	15
<b>Tabla 2.</b> Arreglo experimental para las diferentes combinaciones de extracción etanólica: relación masa-solvente y tiempo de extracción. ....	23
<b>Tabla 3.</b> Resultados de ajuste y análisis de varianza del diseño en estudio.....	29
<b>Tabla 4.</b> Parámetros estimados de las extracciones etanólicas .....	29
<b>Tabla 5.</b> Análisis de los efectos para las extracciones. ....	30
<b>Tabla 6.</b> IC <sub>50</sub> (µg/mL) de los extractos etanólicos de las especies de <i>Ganoderma</i> en las diferentes líneas celulares estudiadas.....	33
<b>Tabla 7.</b> IC <sub>50</sub> (µg/mL) de los extractos etanólicos de las especies de <i>Ganoderma</i> sobre la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7. ....	36
<b>Tabla 8.</b> IC <sub>50</sub> de los extractos etanólicos de las especies de <i>Ganoderma</i> de los ensayos DPPH y ABTS .....	39
<b>Tabla 9.</b> Capacidad antioxidante expresada en equivalentes de Trolox .....	42
<b>Tabla 10.</b> MIC <sub>50</sub> de los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> (NA: No activo).....	44
<b>Tabla 11.</b> Contenidos totales de fenoles y flavonoides en los extractos etanólicos de <i>Ganoderma</i> . ....	46
<b>Tabla 12.</b> Correlación entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante .....	47

## NOMENCLATURA

**% p/v** porcentaje peso por volumen

**µg/mL** microgramo por mililitro

**µL** microlitro

**µm** micrómetro

**ABTS** ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**AG** ácidos ganodéricos

**ANDEVA** Análisis de varianza

**ATG** Genes relacionados con la autofagia

**Da** dalton

**DMEM** medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO** Dimetil sulfóxido

**DPPH** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**ERK** Quinasa regulada por señales extracelulares

**ERN** Especies Reactivas de Nitrógeno

**ERO** Especies Reactivas de Oxígeno

**g** gramo

**IC<sub>50</sub>** Concentración inhibitoria mínima requerida para inhibir el 50%

**INEGI** Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía

**iNOS** isoforma inducible óxido nítrico sintasa

**JNK** quinasas c-Jun N-terminal

**LPS** Lipopolisacáridos

**MAPK** Proteína quinasa activada por mitógenos

**mg/mL** miligramo por mililitro

**MIC<sub>50</sub>** Concentración inhibitoria mínima requerida para inhibir el crecimiento del 50% de los organismos

**mm** milímetro

**mTOR** Proteína diana de rampamicina en los mamíferos

**MTT**

**NF-κB** Factor nuclear kappa B

**nm** nanómetro

**NOS** óxido nítrico sintasa

**°C** grado Celsius

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**ON** Óxido Nítrico

**p53** Proteína supresora de tumores

**PBS** Tampón fosfato salino

**PN** Productos naturales

**rpm** revolución por minuto

**DE** desviación estándar

**TA** temperatura ambiente

**TNF- $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**UFC/mL** unidades formadoras de colonia por mililitro

**$\mu$ M** micromolar

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### Introducción

El cáncer continúa siendo una de las enfermedades más agresivas a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera como la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones (OMS, 2018). En México, la mortalidad por cáncer ha presentado un comportamiento histórico de tendencia ascendente; considerándose la tercera causa de muerte en el país, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Los tratamientos convencionales no son totalmente eficientes, provocando muchos efectos secundarios y secuelas a largo plazo, las que atentan contra la calidad de vida de los enfermos.

Los productos naturales (PN) han jugado un papel muy significativo a lo largo de los años en el descubrimiento de nuevos medicamentos. Esto resulta evidente en el tratamiento del cáncer en donde el 79.8% de los medicamentos aprobados tienen relación con productos naturales; en cuanto a los fármacos antibacterianos, fungicidas, antiparasitarios y antivirales, el 68.4% son de origen natural (Jiménez, 2013). La importancia de los PN en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos es expuesta por diferentes autores como (Zhong y Xiao, 2009; Theis y Lerdau, 2016; Seca y Pinto, 2018; Sierra *et al.*, 2018) donde se reportan un gran número de compuestos con potencial terapéutico aislados a partir de organismos pertenecientes a diferentes reinos.

Los hongos *Ganoderma* han permanecido en la cumbre de la medicina tradicional asiática por más de 2000 años debido a los múltiples efectos benéficos relacionados con la prevención y tratamiento de enfermedades. Los productos derivados de estos organismos poseen los índices más altos de venta en la industria de nutraceuticos de

Oriente y Estados Unidos (Bishop *et al.*, 2015). Desde 1980 las estructuras de estos hongos como sus cuerpos fructíferos y esporas, han recibido mucha atención en la medicina homeopática y como fuente promisoría de nuevos medicamentos (Ćilerdžić *et al.*, 2014). Investigaciones recientes (Cheng *et al.*, 2010; Figlas y Curvetto, 2012; Ayala *et al.*, 2016) sobre los constituyentes químicos de *Ganoderma* revelan la presencia de múltiples productos naturales incluidos triterpenos, polisacáridos, flavonoides, fenoles y otros compuestos con numerosas actividades biológicas: citotóxicas (Cheng *et al.*, 2010), inmunomoduladoras, hepatoprotectoras (Figlas y Curvetto, 2012), antitumorales, antioxidantes (Islas *et al.*, 2017), antiinflamatorias, antivirales (Zhang *et al.*, 2014), antiplasmodiales, antibacterianas (Guzman y Morales, 2016).

Estudios farmacológicos reportan más de 431 metabolitos secundarios de varias especies de *Ganoderma*. Igualmente se ha reportado la caracterización de sus estructuras químicas y actividades biológicas (Trigos y Suárez, 2011a; Baby, Johnson y Govindan, 2015; Obodai *et al.*, 2017). Las moléculas bioactivas presentes en este género que son más estudiadas actualmente son los polisacáridos, los cuales muestran principalmente actividad antioxidante e inmunomoduladora (Trigos y Suárez, 2011a) y los triterpenoides derivados del lanosterol como ácidos ganodéricos (AG) y moléculas relacionadas que exhiben una potente actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiviral (Xu, Zhao y Zhong, 2010) e inmunomoduladora (Wang *et al.*, 2007).

A nivel mundial existen 224 especies (Roskov *et al.*, 2020), en México se han registrado la existencia de alrededor de 16 especies de *Ganoderma* (López *et al.*, 2016). El género es frecuentemente observado en regiones tropicales, subtropicales y templadas. En Sonora se conoce su distribución en la zona urbana de Hermosillo, Reserva Forestal Nacional y Refugio de Fauna Silvestre Ajos-Bavispe, Sierra de Yécora, Sierra de Mazatán y Sierra de San Javier; donde se han encontrado especies de *Ganoderma*: *G. applanatum*, *G. curtisii*, *G. lobatum*, *G. oerstedii*, *G. sessile*, *G. sessiliforme* y *G. weberianum* (López *et al.*, 2016). Estudios recientes demuestran la actividad antiproliferativa de extractos de dos fases de desarrollo (micelio dicariótico y cuerpos fructíferos) de aislados de *G. subincrustatum* y *G. weberianum* de Sonora, sobre distintas líneas celulares. Concluyendo que los extractos de cuerpos fructíferos presentan mayor actividad que los de micelio; el extracto completo de los cuerpos fructíferos de *G.*

*subincrustatum* presentaron mayor actividad antiproliferativa ( $IC_{50}$ :  $<25 \mu\text{g/mL}$ ) sobre todas las líneas evaluadas (HeLa, Raw 264.7, A549 y L-929) (López, 2016). Por todo lo planteado anteriormente en este trabajo se propuso como objetivo determinar el perfil químico y la capacidad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena y antibacteriana de extractos etanólicos de basidiomas de cepas de *Ganoderma* spp. nativas de Sonora cultivadas en madera de vid.

### **1.1.Objetivo General**

Evaluar la capacidad antiproliferativa, antiinflamatoria, antioxidante, y antibacteriana de extractos etanólicos de basidiomas de cepas de *Ganoderma* (EEBG) nativas de Sonora cultivadas en madera de vid.

### **1.2.Objetivos Específicos**

- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de EEBG en las líneas celulares: MDA, A549, HeLa y Arpe-19
- Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de EEBG mediante la cuantificación de la producción de ON en células RAW 264.7 activadas con LPS.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de EEBG por las técnicas: DPPH, ABTS y FRAP.
- Evaluar las propiedades antibacterianas de EEBG sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 2.1.El Cáncer

El cáncer comprende varios tipos de enfermedades caracterizadas por una división celular anormal. Estas anomalías pueden ser ocasionadas por diversos factores: externos (sustancias químicas, radiaciones, organismos infecciosos) e internos (mutaciones hereditarias, hormonas, condición inmunológica y mutaciones que ocurren por el metabolismo) que pueden dañar el genoma; sin embargo, este cuenta con varios mecanismos de reparación que frenan el ciclo celular permitiendo a la célula reparar el daño. Si estos mecanismos fallan, la célula programa su muerte a partir de la proteína supresora de tumores p53; cuando la apoptosis no se puede llevar a cabo y la célula se empieza a reproducir sin control es cuando se considera que comienza el desarrollo del cáncer. El grado de malignidad del cáncer es variable, básicamente depende de la agresividad de sus células y características biológicas. Son capaces de diseminarse y provocar metástasis en órganos y tejidos distantes. Su velocidad de crecimiento va más allá de los límites normales y sus vías de diseminación pueden ser a través del sistema linfático (diseminación linfática) o del circulatorio (diseminación hemática) o por extensión e invasión directa a los tejidos vecinos (Martín y Domingo, 2011).

##### 2.1.1.Estadísticas

Desde el siglo pasado, el cáncer ha sido considerada una enfermedad que paulatinamente se convirtió en un problema de salud pública a nivel mundial. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere al cáncer como la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8.8 millones de defunciones, donde alrededor

del 70% se registran en países de medio y bajo ingreso. Entre los tipos de cáncer que causaron mayor número de fallecimientos se encuentra el pulmonar (1.69 millones), hepático (788,000), colorrectal (774,000), gástrico (754,000), y de mama (571,000) (OMS, 2018).

En México la mortalidad por cáncer ha presentado un comportamiento histórico de tendencia ascendente. Las cifras se consideraban alarmantes desde 1999, reportándose 53.6 muertes por cada 100 mil habitantes; las cuales aumentaron a 55.2 en el 2001 y 66.6 en el 2008 (Rizo Ríos *et al.*, 2015). La tasa estimada de mortalidad por cáncer en para 2020 crecerá a 79 por cada 100 000 habitantes y se proyecta que para 2020 un total de 1,262,861 personas vivirán con cáncer en México. Se estima que durante 2018 ocurrieron 190,667 casos nuevos de cáncer; de éstos, 7,811 fueron de pulmón (Charvel *et al.*, 2019). De acuerdo con los datos reportados por el Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía (INEGI), el cáncer continúa ocupando el tercer lugar como causa de muerte en el país, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En el periodo de 2011 a 2016, 2 de cada 100,000 habitantes de 0 a 17 años fallecen anualmente por un tumor en órganos hematopoyéticos (conformado entre otros, por la leucemia). Entre los jóvenes de 18 a 29 años, mueren tres de cada 100,000 hombres contra dos de cada 100,000 mujeres por esta causa. Tres de cada 10 muertes por cáncer en la población de 30 a 59 años, son consecuencia del cáncer en órganos digestivos. Para la población de 60 y más años, de 2011 a 2016, cuatro de cada 10 defunciones por cáncer en mujeres se deben a tumor en órganos digestivos, contra tres de cada 10 en varones, por la misma causa. Respecto al cáncer de mama, se observan 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años y más (INEGI, 2018).

### **2.1.2.La inflamación**

“La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica” (García, 2008). Se caracteriza por cinco signos clínicos: rubor, calor, dolor, tumor e impotencia funcional; los cuales son causados por la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y derivados de la sangre hacia sitios de los tejidos extravasculares donde haya tenido lugar

una infección o cualquier otro tipo de agresión al organismo (González *et al.*, 2011). La respuesta inflamatoria es benéfica si es breve y se localiza en el sitio del daño; sin embargo, en ciertas situaciones como en reacciones alérgicas y enfermedades crónicas, el proceso inflamatorio constituye el mecanismo patogénico básico (Vega, 2008). La inflamación presenta dos fases: aguda y crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial de la inflamación; sus características fundamentales son la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema), y la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) hacia el tejido afectado. La inflamación crónica tiene una duración mayor y está relacionada con la respuesta dada por los linfocitos y los macrófagos, por la proliferación de vasos sanguíneos y la disfunción del endotelio, así como por la fibrosis y necrosis tisular. Esta se presenta cuando la inflamación aguda no ha logrado mitigar el estímulo nocivo o cuando la misma respuesta inflamatoria se autoperpetúa (Lisset *et al.*, 2015; González y Padrón, 2019).

### **2.1.3.Radicales libres**

Los radicales libres son átomos o grupos de estos que tienen un electrón desapareado, son muy reactivos y tienden a captar un electrón de otras moléculas estable con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos; debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indistinta sobre moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello y Suwalsky, 2006). Nuestro metabolismo genera distintos tipos de radicales libres como: Especies Reactivas de Oxígeno (ERO: el anión superóxido, el anión peróxido, el radical perhidroxilo, el radical hidroxilo) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN: óxido nítrico, radical peroxinitrito), entre otros. Los radicales libres también son generados por factores como: la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas. En condiciones fisiológicas normales los radicales libres no son dañinos para nuestro organismo y están involucrados en diversos

procesos fisiológicos que son benéficos para el medio celular. Nuestro organismo se encarga de neutraliza las ERO a través de varios mecanismos antioxidantes que involucran la producción de enzimas como el superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras, para prevenir el daño oxidante. Cuando las defensas antioxidantes se ven superadas por especies oxidantes se establece una situación conocida como estrés oxidativo, situación que afecta indistintamente a diversas biomoléculas, ocasionando diversas mutaciones en el ADN, oxidación de moléculas de glucosa, peroxidación de lípidos, que respectivamente están relacionadas con enfermedades crónico degenerativas como cáncer, diabetes y diversas patologías cardiovasculares (Maldonado *et al.*, 2010; Constanza y Muñoz, 2012).

#### **2.1.4. Los productos naturales como alternativa para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.**

Más de 3 mil millones de años de evolución y selección natural han producido una extensa variedad de formas de vida adaptadas a su ambiente natural. Esas formas de vidas desarrollaron adaptaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas como estrategias de supervivencia frente a la presión de la selección natural. De especial interés resultan aquellas adaptaciones que dieron origen a la aparición del metabolismo secundario o también llamado metabolismo especial, del cual provienen todos los compuestos orgánicos conocidos como metabolitos secundarios o productos naturales (Murillo, 2003). Los productos naturales son estructuras privilegiadas en la búsqueda de nuevos fármacos porque estos compuestos cumplen uno de los requisitos fundamentales que deben cumplir muchos fármacos, la afinidad a proteínas y otras biomacromoléculas como los ácidos nucleicos y carbohidratos. Si a esto sumamos el hecho de que poseen las dimensiones moleculares adecuadas para penetrar las barreras biológicas y llegar a ciertas células u órganos donde ejercer su efecto (permeabilidad celular), nos da una clara idea de la extraordinaria ventaja que poseen sus estructuras, esto justificaría la gran efectividad (Mentel y Breinbauer, 2007).

Históricamente los productos naturales siempre se han asociado con el reino *Plantae*; sin embargo, estudios de los compuestos químicos de origen biológico, ha demostrado que hay vida más allá de los vegetales. El aislamiento, caracterización química y pruebas

de actividad biológica de los metabolitos producidos por hongos, forman parte del repertorio tradicional de temas estudiados por la química de productos naturales. En 1896, Gasio publicó detalles de un compuesto químico que resultó ser ácido micofenólico; en 1912, Alsberg estudió extractos de maíz infestado de moho; en 1929, Fleming descubrió la penicilina; durante los años treinta del siglo pasado, el grupo de Rastrick aisló y caracterizó cerca de 200 metabolitos producidos por miembros del reino Fungi (Suárez *et al.*, 2018). La importancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos es claramente mostrada por diferentes autores como (Zhong y Xiao, 2009; Theis y Lerda, 2016; Seca y Pinto, 2018; Sierra *et al.*, 2018), donde se muestran un gran número de compuestos con potencial terapéutico aislados a partir de organismos pertenecientes a diferentes reinos.

Las dos principales áreas en donde los productos naturales han tenido mayor impacto son en el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas. Un análisis desde 1940-2010 plantea que, de los 175 nuevos fármacos anticancerosos aprobados en ese período, 131 (74.9%), tienen alguna relación con la estructura de un producto natural y 85 (48.6%) derivan directamente de ellos. Incluso, cuando este análisis recoge un periodo más reciente entre 1981-2010, donde se aprobaron un total de 99 fármacos, dicho porcentaje no solo no decrece, sino que aumenta, pasando al 79.8%. En cuanto a los fármacos antibacterianos, fungicidas, antiparasitarios y antivirales; de forma global, se aprobaron en esos 30 años un total de 193 fármacos, de los que el 68.4% corresponden a los relacionados con los productos naturales. En el caso específico de los antibacterianos (104 en total), ese porcentaje llega al 75% (78) (Jiménez, 2013).

## 2.2. El Reino Fungi

El reino Fungi representa uno de los conjuntos más amplio de biodiversidad con actividades ecológicas en todos los ecosistemas y con una gran variabilidad en morfología. Los organismos incluidos en esta categoría pueden ser descritos como eucariotas, uni o pluricelulares, filamentosos con crecimiento apical, heterótrofos por absorción, desprovistos de clorofila, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas, y con pared celular principalmente constituida por quitina (Aguirre *et al.*, 2014).

El estado actual de los sistemas de clasificación de los hongos todavía es inestable. Los criterios según los cuales se clasifican, (Reino, Filos, Clases, Órdenes, Familias, Géneros y especies) están aún sujetos a discusión, no existe una clasificación definitiva y aceptada por todos. Los hongos se dividen en verdaderos e imperfectos, los hongos verdaderos se clasifican en cinco phylo: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota; los imperfectos se les conoce también como Deuteromycota u hongos mitospóricos (Estrada y Ramirez, 2019). Actualizaciones recientes han agregado los phylo Entomophthoromycota y Glomeromycota al árbol taxonómico (Roskov *et al.*, 2020). Las clasificaciones modernas tienen en cuenta las características microscópicas, además el avance de la biología molecular está provocado profundos cambios en la taxonomía de los hongos.

Hasta el 2008 existía 97,330 especies descritas en el mundo; en la actualidad (Roskov *et al.*, 2020) reporta la existencia de 147,934 especies. Sobre la diversidad de hongos en el planeta se han planteado varias hipótesis; desde la existencia de 1.5 millones de especies por Hawksworth en 1991 hasta 5.1 millones por O'Brien en el 2005 (Blackwell, 2011). En México se estima la existencia de 200,000 especies de hongos, de ellas descritas solo el 5% aproximadamente (Aguirre *et al.*, 2014). La diversidad fúngica de Sonora, incluyendo algunos Protozoa afines, es de 658 especies: Basidiomycota (461), Ascomycota (105), Myxogastria (81), Glomeromycota (7), Zygomycota (2), Chytridiomycota (1) y Protostelia (1) (Esqueda *et al.*, 2010).

### **2.2.1. Familia Ganodermataceae**

La familia Ganodermataceae consta de 11 géneros: *Amauroderma*, *Elfvigia*, *Foraminispora*, *Furtadoa*, *Ganoderma*, *Ganodermites*, *Haddowia*, *Humphreya*, *Polyporopsis*, *Tomophagus*, *Trachyderma*; presenta una amplia distribución y se tiene registro de 316 especies (Roskov *et al.*, 2020). Esta familia se distingue de otras por tener un tipo peculiar de basidiosporas de doble pared, la pared interna de las esporas a menudo es coloreada, y generalmente la superficie ornamentada. El sistema de hifas suele ser trimítico y ocasionalmente dimítico o monomítico, que contiene hifas generativas hialinas, de paredes delgadas, ramificadas, pinzadas, pigmentadas, de paredes gruesas, arboriformes o aciculiformes, esqueléticas ramificadas e hifas de unión

ramificadas con terminales incoloras (Costa *et al.*, 2017; Hapuarachchi *et al.*, 2018, 2019).

### 2.2.2. Género *Ganoderma*

*Ganoderma* P. Karst pertenece al reino de los hongos, filo Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Polyporales y familia Ganodermataceae (Lin *et al.*, 2019). Es un género con distribución cosmopolita, que se puede encontrar en áreas tropicales, templadas y desérticas. La plasticidad morfológica hace de *Ganoderma* uno de los géneros más complejos de Polyporales; muestra de ello son los 290 nombres publicados, muchos de ellos considerados sinónimos (López *et al.*, 2019); en la actualidad se tiene registro de alrededor 224 especies en todo el mundo (Roskov *et al.*, 2020). Este género produce dos tipos de basidiomas, dependiendo de la especie: basidiomas lacados con una superficie superior brillante o basidiomas no lacados con una superficie superior opaca (Hapuarachchi *et al.*, 2018). *Ganoderma* poseen una cutícula característica de color marrón claro a púrpura oscuro, presentan poros pequeños a medianos, con tubos por lo general estratificados, ocráceos, en ocasiones blanquecinos y el contexto varía de blanco a marrón (Wang *et al.*, 2012).

### 2.2.3. *Ganoderma* en Sonora, México

El género *Ganoderma* presenta una amplia distribución en Sonora, debido a la diversidad de ecosistemas, resultado de su gran extensión territorial y su ubicación biogeográfica, en una zona de transición entre la región Neotropical y la región Neártica; se tiene registro de la existencia de 11 especies de *Ganoderma* en Sonora: *G. curtisii*, *G. applanatum*, *G. coffeatum*, *G. lucidum*, *G. sessiliforme*, *G. adpersum*, *G. lobatum*, *G. oerstedii*, *G. sessile*, *G. weberianum* y *G. subincruiatum* (Esqueda *et al.*, 2010; Raymundo *et al.*, 2013; López *et al.*, 2016, 2019).

#### ***Ganoderma oerstedii***

*Ganoderma oerstedii* **Figura 1** citada por (López *et al.*, 2016), encontrado en el Municipio de Ures, Sierra de Mazatán, proveniente de mezquite, zona donde se

registran temperaturas superiores a 40 °C. Se recolectó sobre la base de *Stenocereus thurberi*, primer registro de la especie desarrollándose sobre una cactácea. Entre las características morfológicas descritas, los ejemplares presentaban basidiomas de 105-133 × 85-100 × 28-31 mm, perenne, sésil, fuertemente adherido, leñoso. Píleo flabeliforme-semicircular a irregular; superficie glabra, lisa a irregular, con una capa de laca brillante, la cual puede perderse con el tiempo, sulcada concéntricamente; marrón-rojizo oscuro en casi toda la superficie, con tonalidades anaranjadas hacia el margen. Contexto zonado, con bandas e incrustaciones resinosas conspicuas. Elementos de la cutícula de 40-67.7 × 7.7-12 µm, claviformes, con ramificaciones y protuberancias tanto laterales como apicales, amarillo dorado. Basidiosporas de (7.4-) 8.3-10 × 5.1-6.3 (-6.5) µm, Q = 1.42-1.67, elipsoides a oblongas, con pilares interparietales parcialmente anastomosados.

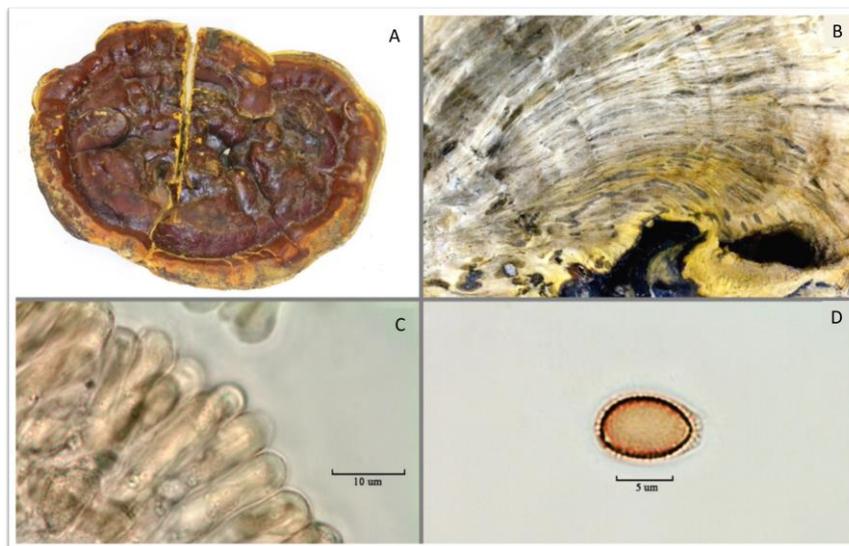


**Figura 1.** *Ganoderma oerstedii*: A) basidioma, B) contexto, C) cutícula. (López *et al.*, 2016).

### ***Ganoderma weberianum***

La especie *Ganoderma weberianum* **Figura 2** citada por (López *et al.*, 2016), localizada en el Municipio de Ures, Sierra de Mazatán, en bosque de encino, sobre la base de un *Quercus* sp. Las características morfológicas, describen la especie por presentar basidioma de 45-200 × 30-185 × 20-52 mm, sésil a subestipitado cuando crece en el suelo sobre raíces, anual, solitario a gregario, de consistencia fibrosa a suberosa. Píleo semicircular a flabeliforme, aplanado a ligeramente convexo; superficie glabra, cubierta por una capa de laca brillante, con zonas opacas, abollada a irregular, ligeramente sulcada concéntricamente; marrón-rojizo en la base o en el centro cuando subestipitada, amarillo-parduzco a blanco-anaranjado hacia el margen, el cual es estéril, obtuso a

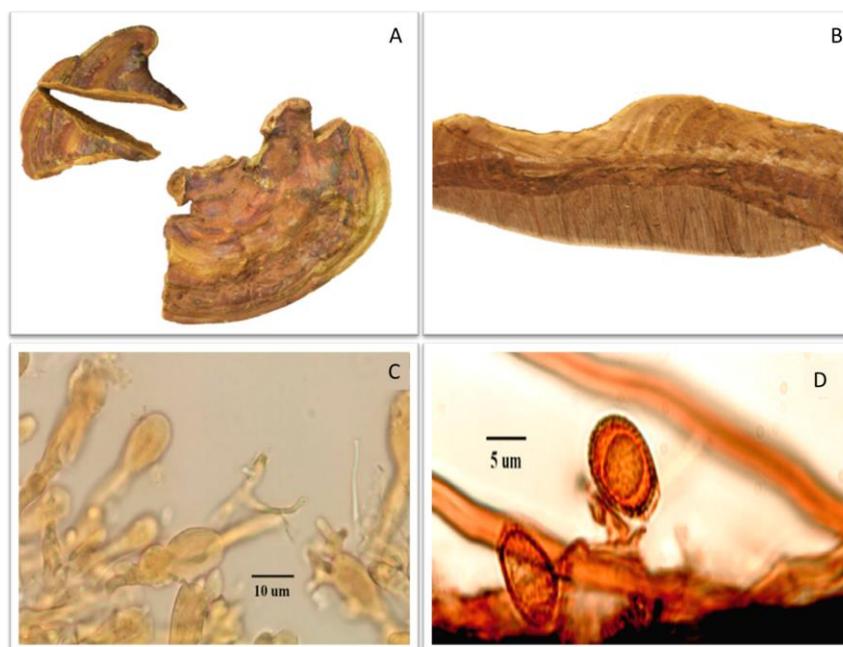
agudo, blanco-anaranjado en fresco, marrón a negro cuando seco. Contexto de hasta 30 mm de grosor, relativamente homogéneo, zonado, con incrustaciones resinosas difíciles de observar, más conspicuas en la base, ausentes en algunos ejemplares, blanco anaranjado a anaranjado pálido. Tubos de hasta 18 mm de largo, marrón-amarillento. Poros de 3–6 por mm, redondeados a angulados, concoloros con el margen, el cual es irregular, con zonas marrón cuando seco, de 122–287  $\mu\text{m}$  diámetro; disepimiento de 25–94  $\mu\text{m}$ . Sistema hifal dimítico. Hifas generativas de la trama del contexto no observadas; hifas esqueléticas de 2.1–9.7  $\mu\text{m}$  diámetro, de pared gruesa a sólidas, sin septos, arboriformes y aciculiformes, amarillo pálido. Elementos de la cutícula de 33.8–50.6  $\times$  6.5–12.2  $\mu\text{m}$ , cilíndricos a claviformes, con una o dos protuberancias o ramificaciones laterales a enteros, con gránulos en el ápice, amarillos; hifas generativas de 3.1–5.6  $\mu\text{m}$  diámetro, pared delgada, con fíbulas, hialinas; hifas esqueléticas de 1–5.7  $\mu\text{m}$  diámetro, pared gruesa a sólida, amarillo oro; hifas conectivas de 1–2.1  $\mu\text{m}$  diámetro, ramificadas, pared gruesa a sólida, amarillenta a hialina. Basidiosporas de 7.4–10.3  $\times$  5.3–6.7 (–7.1)  $\mu\text{m}$ , Q = 1.22–1.66, generalmente elipsoides, algunas ampliamente elipsoides u oblongas, ápice truncado, perisporio perforado, exosporio con pilares interparietales sublibres a libres, delgados, marrón-amarillento.



**Figura 2.** *Ganoderma weberianum*: A) basidioma, B) contexto, C) cutícula, D) basidiosporas. (López *et al.*, 2016).

### ***Ganoderma subincrustatum***

*Ganoderma subincrustatum* **Figura 3** citada por (López *et al.*, 2019), encontrada en la base de un *Prunus persica* (L.) Batsch vivo, en un huerto de duraznos, en La Costa de Hermosillo. La especie presenta basidiomas de 178-270 x 117-124 x 22-70 mm, sésil a subestipitado, fibrosos a esponjosos. Píleo flabeliforme, superficie glabra, lisa, ligeramente abollada y ondulada, brillante a opaca, con surcos semi-concéntricos, más conspicuos en el margen, cutícula de color naranja claro, dorado rojizo, naranja intenso, marrón claro, marrón rojizo, marrón oscuro a foto marrón, casi negro en algunas zonas, con surcos de color amarillo intenso debido al desprendimiento de la cutícula; basidiosporas cubierta de una capa de color marrón, margen estéril, obtuso, liso, con zonas de surcos, amarillo pálido, con zonas de color naranja amarillento, amarillo grisáceo después del contacto. Contexto de hasta 22 mm de grosor, fibroso-esponjoso, no completamente homogéneo, con una banda de color amarillo intenso debajo de la cutícula, naranja claro a marrón hacia los tubos, zonado concéntricamente, con dos bandas resinosas, la parte superior engrosada, ambas intermitentes. Sistema de hifas trimítico. Hifas generativas de 1.6-7.2 µm de diámetro, tabicadas, fibuladas, amarillo pálido a hialinas, generalmente colapsadas; hifas esqueléticas arboriformes de 1.6-7.2 µm de diámetro, no ramificadas, paredes gruesas, marrón claro; hifas conectivas de 1.6-3.2 µm de diámetro, ramificadas, paredes gruesas, hialinas a amarillo pálido. Basidiosporas de (8-)9.6-11.2(-12.8) x 5.6-8 µm, Q= 1.49-1.64, elipsoides a oblongos, ápice truncado, con poro germinal apical, exosporio con pilares entre paredes sublibres a parcialmente anastomosados, marrón rojizo.



**Figura 3.** *Ganoderma subincrustatum*: A) basidioma, B) contexto, C) cutícula, D) basidiosporas. (López *et al.*, 2019).

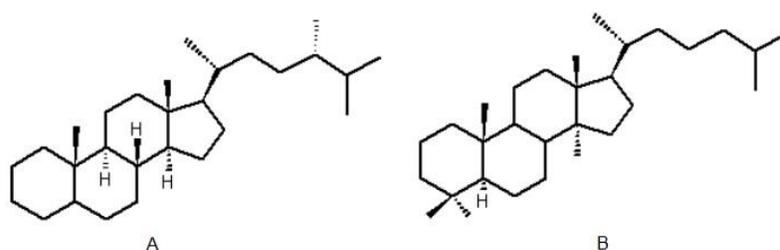
## 2.3. Metabolitos secundarios de *Ganoderma*

Las actividades biológicas de *Ganoderma* se pueden atribuir a su diversa composición de metabolitos, donde se han aislado e identificado más de 600 compuestos bioactivos diferentes; entre ellos triterpenos, meroterpenoides, esteroides, alcaloides, nucleósidos, nucleobases y polisacáridos. Las moléculas bioactivas que contribuyen a los diversos beneficios para la salud más estudiadas actualmente, son los triterpenoides y los polisacáridos (Lin *et al.*, 2019).

### 2.3.1. Triterpenoides

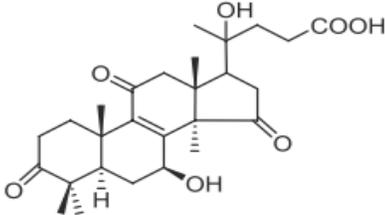
Los triterpenoides aislados de *Ganoderma* **Tabla 1** son compuestos tetracíclicos y pentacíclicos. Sus estructuras químicas son más complejas que las de otros lanostanos, debido a su estado altamente oxidado; generalmente contienen 30 ó 27 átomos de carbono y algunos tienen 24 (Lin *et al.*, 2019).

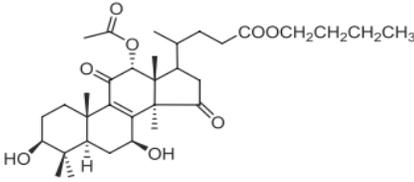
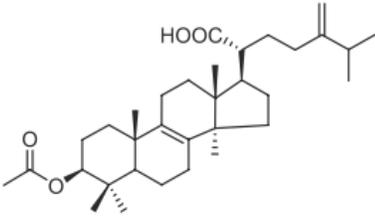
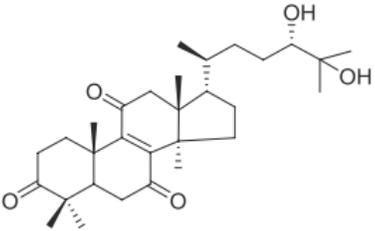
Kubota aisló ácido ganodérico A y ácido ganodérico B de *G lucidum* en 1982. Desde entonces, se han aislado más de 316 triterpenos de los cuerpos fructíferos, esporas y micelios de diferentes especies de *Ganoderma* (Xia *et al.*, 2013); dentro de los más comunes, se encuentran los triterpenoides de esqueleto Ergostano y Lanostano **Figura 4** como ácidos ganodéricos, ácidos ganoderénicos, ácidos ganolucídicos, ácidos lucidénicos, ganoderioles, ganoderales (Mora, 2010); que consideran los principales contribuyentes de la actividad citotóxica (Cheng *et al.*, 2010), antiinflamatoria (Ko *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2019), antiviral (Zhang *et al.*, 2014) y antioxidantes (Wang *et al.*, 2019).



**Figura 4.** Esqueletos básicos de algunos triterpenoides aislados de *Ganoderma*. A) Ergostano, B) Lanostano. (Mora, 2010)

**Tabla 1.** Triterpenoides aislados de especies de *Ganoderma*.

Especie	Compuesto	Actividad	Referencia
<i>G. sinense</i>	 20-hydroxylucidinic acid A	Antiviral	(Sato <i>et al.</i> , 2009)

<i>G. lucidum</i>	 <p>Butyl lucidenate P</p>	Antiinflamatoria	(Tung <i>et al.</i> , 2013)
<i>G. atrum</i>	 <p>3β-acetoxy-5-lanosta-8,24(24′)-dien-21-oic acid</p>	Neuroprotectora Antioxidante	(Qiu, Wang y Song, 2016)
<i>G. lingzhi</i>	 <p>Lucidumol C</p>	Citotóxica	(Amen <i>et al.</i> , 2016)

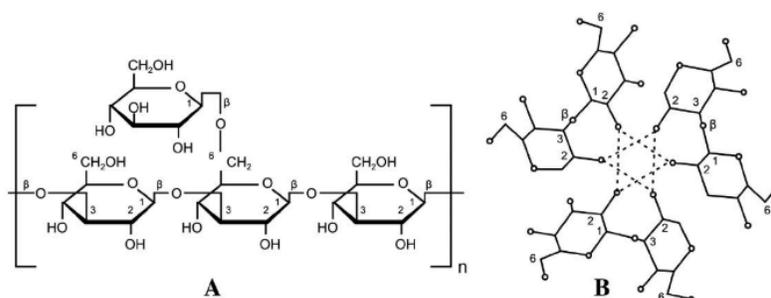
### 2.3.2. Polisacáridos

Los polisacáridos son biomoléculas compuestas por largas cadenas de monosacáridos, unidas entre sí por enlaces glicosídicos. Los pesos moleculares de los polisacáridos oscilan entre  $4 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  Da. (Bishop *et al.*, 2015). Estudios recientes informan que se han aislado y purificado más de 200 polisacáridos de los cuerpos fructíferos, esporas, micelios y caldo de cultivo de *Ganoderma* (López, Arboleda y Segura, 2015).

Los polisacáridos como los β-D-glucanos, los heteropolisacáridos y las glicoproteínas se consideran los principales contribuyentes de la bioactividad de *Ganoderma*, los β-D-glucanos consisten en una estructura lineal de grupos D-glucopironano unidos a través

de enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) con diversos grados de ramificación desde la posición C6 **Figura 5** (Sanodiya *et al.*, 2009).

Los polisacáridos constituyen una de las principales fuentes de compuestos farmacológicamente activos de las especies de *Ganoderma*; muestran una gran cantidad de bioactividades, que incluyen inmunorregulación, inhibición de la proliferación vascular, promoción de la liberación de insulina, efecto hipoglucemiante, anticancerígeno, antioxidante y antimicrobiano (Bishop *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Estructura de los  $\beta$ -D-glucanos aislado de *G. lucidum* A) Diagrama molecular primario, B) Diagrama molecular de nivel superior. (Sanodiya *et al.*, 2009)

### 2.3.3. Otros compuestos

En el año 2000 se aislaron los primeros meroterpenoides, las ganomicinas A y B del cuerpo fructíferos de *G. pfeifferi*, desde entonces se han aislados 200 meroterpenoides de *Ganoderma* con diversas actividades biológicas, incluida la inhibición del ON, antioxidante, antimicrobiano y citotóxico (Lin *et al.*, 2019); otros meroterpenoides como lingzhine E y F de *G. lucidum*, mostraron actividad antioxidante y efecto neuroprotector (Wang *et al.*, 2019). También se han aislados alcaloides como los sinensines B–E, de *G. sinense* (Liu *et al.*, 2011); compuestos fenólicos de *G. duripora* que han mostraron efecto antiinflamatorio sobre células RAW 264.7, inhibiendo la producción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Liu *et al.*, 2018).

## 2.4. Actividad biológica de *Ganoderma*

Los hongos *Ganoderma* han permanecido en la cumbre de la medicina tradicional asiática por más de 2000 años debido a los múltiples efectos benéficos relacionados con la prevención y tratamiento de enfermedades (Lin *et al.*, 2019). En los últimos años se han identificado un gran número de compuestos, a partir *Ganoderma* ssp. caracterizados por presentar diferentes tipos de actividades biológicas como hipotensoras (Tran *et al.*, 2014), citotóxicas (Nguyen *et al.*, 2015) y (Cheng *et al.*, 2010), inmunomoduladoras (Liu *et al.*, 2015), antitumorales (Cör, Knez y Knez, 2018), antioxidantes (Kozarski *et al.*, 2012), antiinflamatorias (Ko *et al.*, 2008), antivirales (Zhang *et al.*, 2014), antibacterianas (Guzman y Morales, 2016) y antidiabéticas (Ma, Hsieh y Chen, 2015; Rašeta *et al.*, 2020), entre otras, siendo ampliamente utilizadas en el ámbito medicinal y farmacéutico.

### 2.4.1. Anticancerígena

La actividad anticancerígena de las especies de *Ganoderma* se ha comprobado en ensayos *in vitro* e *in vivo*, observado actividad en extractos crudos y moléculas aisladas de distintas especies. Extractos de *G. weberianum* y *G. subincrustatum* de micelios y cuerpos fructíferos mostraron actividad antiproliferativa sobre líneas celulares HeLa, RAW 264.7 y A549, donde los extractos de cuerpos fructíferos mostraron mayor actividad; igualmente, el extracto de *G. subincrustatum* presentó actividad inhibidora con valores de  $IC_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$  (López, 2016). Triterpenos aislados de cuerpos fructíferos de *G. lucidum* mostraron actividad citotóxica frente a la línea celular PC-3 con una  $IC_{50}$  de  $11.5 \mu\text{M}$  (Nguyen *et al.*, 2015).

Estudios preliminares demostraron que ácido ganodérico aislado de *G. lucidum*, inhibía tanto el crecimiento tumoral como la metástasis pulmonar del carcinoma pulmonar de Lewis en ratones C57BL/6 (Wang *et al.*, 2007). Extractos etanólicos del micelio de *G. lucidum*, *G. tsugae*, *G. oerstedii*, *G. subamboinense* y *G. resinaceum*, inhibieron de forma significativa la proliferación de la línea celular HL-60, induciendo la apoptosis temprana en las células (Zhou *et al.*, 2006). La actividad anticancerígena no está probada en humanos; sin embargo, estudios clínicos sugieren que algunos compuestos aislados de las especies del género, tienen utilidad como coadyuvantes en terapias tradicionales,

mejorando algunos parámetros hematológicos, reduciendo los síntomas y mejorando la calidad de vida en pacientes con cáncer (Ulbricht *et al.*, 2010).

#### 2.4.2. Antiinflamatoria

De *Ganoderma* se han expuestos diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* que han evaluado la actividad antiinflamatoria de diferentes especies. Los compuestos fenólicos aislados de *G. duripora*, mostrando efectos antiinflamatorios dependientes de la dosis en células RAW 264.7; además, estos inhibían la producción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) y prostaglandina E2 (PGE2) mediante la supresión de COX-2, en células de macrófagos inducidos por LPS (Liu *et al.*, 2018).

Algunos triterpenoides y esteroides aislados *G. lucidum* y *G. tsugae* han mostrado actividad inhibitoria sobre los mediadores químicos liberados de mastocitos, neutrófilos y macrófagos en líneas celulares *in vitro* (Ko *et al.*, 2008). Extracto de cloroformo de *G. lucidum* mostraron actividad antiinflamatoria, en modelos inflamatorios agudos inducidos por carragenina y crónicos inducidos por formalina en ratones. El extracto mostró una notable actividad antiinflamatoria en ambos modelos, comparable al diclofenaco, un fármaco de referencia estándar (Joseph *et al.*, 2009).

#### 2.4.3. Antioxidante

Diversos trabajos describen la actividad antioxidante de las especies de *Ganoderma*, entre ellos los realizado por (Mau *et al.*, 2005) y (Tseng, Yang y Mau, 2008) que evaluaron extractos acuosos y metanólicos, así como compuestos polisacáridos de basidiomas de *G. tsugae*, mostrando actividad significativa, excepto por la capacidad de eliminación de radicales hidroxilo; asimismo, (Kan *et al.*, 2015) reportaron que los polisacáridos aislados del cuerpo fructífero de *G. lucidum* mostraron fuerte actividad antioxidante. Otros compuestos como triterpenos aislados de *G. lucidum* en ensayos *in vitro* mostraron potente actividad antioxidante (Wang *et al.*, 2019). Por otra parte, (Zuluaga *et al.*, 2007) evaluaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de *G. lucidum* a través de los métodos DPPH y ABTS mostrando valores de IC<sub>50</sub> de 0.0155 -

0.0807 mg/mL. (Islas *et al.*, 2017) reportaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de basidiomas y micelio de *G. brownii*, *G. applanatum*.

#### 2.4.4. Antibacteriana

De acuerdo con varios estudios, algunos constituyentes de las especies de *Ganoderma*, presentes en extractos acuosos y orgánicos, serían capaces de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Batra, Sharma y Khajuria, 2013). Asimismo triterpenoides aislados de *G. applanatum* exhiben actividad antibacteriana principalmente contra bacterias Gram positivas, tales como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Gerber *et al.*, 2000); mientras que (Guzman y Morales, 2016) evaluaron los extractos de *G. applanatum* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginos* obtenido resultados positivos frente la cepa *S. aureus* con una concentración inhibitoria mínima 31.25 mg/ml. En otro estudio realizado por (Li *et al.*, 2012) donde evaluaron extractos de *G. atrum* frente a cepas de *Staphylococcus aureus subsp. Aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Proteusbacillus vulgaris*, mostraron que el efecto antibacteriano dependía de la dosis; donde *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli* fueron más sensibles a los tratamientos, presentando concentración inhibitoria mínima en el rango de 1.56 a 25 mg/ml y el rango de valores de la concentración bactericida mínima fue de 3.125 a 25 mg/ml.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

##### 3.1.1. Basidiomas de *Ganoderma*

Los basidiomas de las especies de *Ganoderma* nativas de Sonora: *G. oerstedii* (BH-17), *G. weberianum* (BH-21), *G. subincrustatum* (BH-1); y una cepa comercial de *G. lucidum* (Fr) Karst (FP-34D) adquirida en Fungi Perfecti, EUA, fueron donados por el Laboratorio de Biotecnología de Hongos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C (CIAD), donde los cuerpos fructíferos se desarrollaron bajo las condiciones reportadas por (Morales, 2015).

##### 3.1.2. Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 5 % de suero fetal bovino y penicilina (100 U/mL) en cajas de 25 cm<sup>2</sup>. Las células se colocaron en una incubadora isotérmica (Fisher-Scientific) a una temperatura de 37 °C, al 5 % de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 95 %. Las líneas celulares cancerosas HeLa (carcinoma de cuello uterino humano), A549 (carcinoma de pulmón humano) se adquirieron en American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). RAW 264.7 (macrófagos transformados por virus de la leucemia de Albeson) fueron amablemente donados por el Dr. Emil R. Unanue (Department of Pathology and Immunology, Washington University in St. Louis, MO).

### 3.1.3. Cultivo bacteriano

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos se utilizaron 2 cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) Gram positiva y *Escherichia coli* (ATCC 25992) Gram negativa, obtenidas del cepario de la Universidad de Sonora, campus Hermosillo; se cultivaron periódicamente en agar Müeller-Hinton y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C. Se conservaron las bacterias en crioviales, donde se depositaron 1 mL de caldo BHI/glicerol (10 %) para cada criovial, al cual se le añadió inóculo bacteriano hasta que esta solución tuvo un aspecto turbio, posteriormente se almacenaron a -80 °C.

### 3.2. Obtención de los extractos etanólicos

Los Basidiomas se recibieron secos y se homogenizó el material a un tamaño de malla de 2 a 3 mm en un molino tipo Wiley. A una cantidad de 10 g de basidiomas homogenizado se le adicionó etanol al 96 % para su extracción en una relación (1:30 masa/volumen) y se mantuvo durante 10 d a TA, protegido de la luz, con agitación en zaranda a 150 rpm. Después, se filtró utilizando una gasa para eliminar las partículas grandes y se realizó una segunda filtración con un papel Whatman No.2. Luego se concentraron los extractos en condiciones de presión reducida por medio de un evaporador rotatorio hasta sirope, a temperatura constante de 40 °C y 75 rpm. Se colocaron en la campana en frascos previamente tarados. Los extractos obtenidos se conservaron a -20 °C para su posterior uso en los ensayos.

Con el objetivo de mejorar los porcentajes de extracción del proceso de maceración se estudió los efectos de las variables, relación masa/solvente y tiempo de extracción mediante un diseño factorial completo 4x2 y un análisis de varianza (ANDEVA). Para este se utilizó los basidiomas de *G. oerstedii*; el arreglo experimental se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Arreglo experimental para las diferentes combinaciones de extracción etanólica: relación masa-solvente y tiempo de extracción.

Tratamiento	Variables codificadas	Variables no codificadas	
	X1	masa/solvente (g/mL)	X2 tiempo (días)
1	-1	1/30	5
2	-1	1/30	7
3	-1	1/30	14
4	-1	1/30	21
5	1	1/50	5
6	1	1/50	7
7	1	1/50	14
8	1	1/50	21

### 3.3. Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los extractos etanólicos de *G. oerstedii*, *G. weberianum*, *G. subincrustatum* y *G. lucidum* se determinó por el ensayo de reducción del MTT, método colorimétrico que mide la función metabólica de las células, el MTT es un colorante amarillo pálido soluble en agua, que es reducido rápidamente dentro de células viables a formazán (cristales azul-violeta, insoluble en agua), por las deshidrogenasas mitocondriales de la cadena respiratoria, por lo que la cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células viables (Escobar, Rivera y Aristizábal, 2010).

Para evaluar el efecto de los extractos sobre las líneas celulares se agregaron 50  $\mu$ L de una suspensión celular ajustada a 200,000 células/mL a cada uno de los pozos de la placa de 96 pozos. Se incubó por un periodo de 24 h a 37°C en una atmosfera al 5 % de CO<sub>2</sub>, para que las células se adhieran a la superficie del pozo. Se prepararon diluciones seriadas desde 400 hasta 12.5  $\mu$ g/mL a partir del stock de 40 mg/mL con DMEM suplementado al 5% con suero fetal bovino, de las cuales se agregaron 50  $\mu$ L a cada pozo por triplicado e incubaron durante 48 h. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de la placa y se realizó un lavado con buffer fosfato salino (PBS). Luego, se agregaron a cada uno de los pozos de la placa 90  $\mu$ L de DMEM y 10  $\mu$ L de una solución de MTT (5 mg/mL) y se incubó por 4 h. Finalmente, los cristales de formazán fueron resuspendidos

en isopropanol ácido y se hicieron lecturas de la absorbancia a 570 y 630 nm en un lector de placas (iMARK microplate reader BIO-RAD) (Torres *et al.*, 2019)

### **3.4. Actividad antiinflamatoria**

#### **3.4.1. Evaluación de la producción de ON**

El efecto de los extractos etanólicos de *G. oerstedii*, *G. weberianum*, *G. subincrustatum* y *G. lucidum* sobre la producción de ON en células RAW 264.7 activadas con LPS, se realizó con el reactivo de Griess. Este método utiliza la reacción de diazotación de Griess para detectar espectrofotométricamente el nitrito formado por la oxidación espontánea de ON ante condiciones similares a las fisiológicas. El reactivo contiene ácido sulfanílico y este se convierte en una sal de diazonio por reacción con nitritos en una solución ácida. La sal de diazonio se acopla luego a N-(1-naftil) etilendiamina, formando un colorante azo que se puede cuantificar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm (Probes, 2003). Inicialmente, se preparó una suspensión celular con una densidad de 500,000 cel/mL. Después se adicionaron 100  $\mu$ L de la suspensión celular en una placa de 96 pozos y posteriormente la placa se incubó por 24 h. Después de este periodo, las células fueron estimuladas con LPS (1  $\mu$ g/mL) en presencia o ausencia de los tratamientos a distintas concentraciones (50 hasta 3.1  $\mu$ g/mL) por 20 h. Pasado este periodo, se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante y se agregó junto a un mismo volumen del reactivo de Griess, después de una incubación de 20 minutos a TA, la absorbancia se leyó a 540 nm en un lector de microplacas iMARK BIO-RAD (Paulino *et al.*, 2008; Hernanz y Herrador, 2016).

### **3.5. Actividad antioxidante**

#### **3.5.1. Ensayo DPPH**

Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de *G. oerstedii*, *G. weberianum*, *G. subincrustatum* y *G. lucidum* por el ensayo DPPH (radical libre 2,2-

difenil-1-picrilhidrazilo). Se pesaron 2.5 mg de radical DPPH y se disolvieron en 100 mL de metanol. Se ajustó la solución a una absorbancia de  $0.7 \pm 0.01$  en una longitud de onda de 515 nm. Se preparó un stock de los extractos a una concentración de 40 mg/mL. Para la realización del ensayo se tomaron 280  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH, al cual se le agregó 20  $\mu\text{L}$  del extracto a distintas concentraciones (400 hasta 12.5  $\mu\text{g/mL}$ ), las cuales se evaluaron por triplicado. Se incubó durante 30 min en la oscuridad y se leyó a 515 nm en un espectrofotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Usia *et al.*, 2002). Los resultados se reportaron como  $\mu\text{M}$  equivalente de trolox (ET) / g de peso seco. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  se obtuvieron con un modelo farmacodinámico Ec. (1) (Zou *et al.*, 2020).

$$E = \frac{E_{max} \times C^Y}{\text{IC}_{50}^Y + C^Y} \quad (1)$$

### 3.5.2. Ensayo ABTS

El método del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), basado en la capacidad de atrapar los radicales por la interacción con la sustancia antioxidante. Para la generación del radical se pesaron 19.3 mg de ABTS y se disolvieron en 5 mL de agua destilada, se añadió 88  $\mu\text{L}$  de una solución de persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) a 140  $\mu\text{M}$ , se dejó reposar a TA (25 °C) durante 16 h, protegido de la luz solar. Una vez obtenido el radical ABTS se diluyó en metanol y se ajustó la solución a una absorbancia de  $0.7 \pm 0.01$  en una longitud de onda de 754 nm. En placas de 96 pozos, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de concentraciones decreciente de los extractos (200 hasta 12.5  $\mu\text{g/mL}$ ), diluidas en etanol, que se mezclaron con 245  $\mu\text{L}$  de la solución de radical catiónico ABTS. Se dejó reposar por 5 min a TA, se leyó la absorbancia a 754 nm en un espectrofotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO. Los resultados se reportaron como  $\mu\text{M}$  equivalente de trolox (TE) / g de peso seco (Zuluaga *et al.*, 2007). Los valores de  $\text{IC}_{50}$  se obtuvieron utilizando un modelo farmacodinámico Ec. (1) (Zou *et al.*, 2020).

### 3.5.3. Ensayo FRAP

El método consiste en medir el incremento en la absorbancia que se desarrolla cuando el complejo TPTZ- $\text{Fe}^{+3}$  se reduce a TPTZ- $\text{Fe}^{+2}$  (Benzie y Strain, 1996). El reactivo FRAP

se preparó mediante la mezcla de tampón acetato (0.3 M pH 3.6) con una solución 10 mM de TPTZ (2, 4, 6 tripiridil-s triazina) en HCl 40 mM, y una solución 20 mM de FeCl<sub>3</sub> 6 H<sub>2</sub>O, en una proporción de 10:1:1. Se preparó un stock de los extractos a una concentración de 40 mg/mL. Para la realización del ensayo se tomaron 280 µL, al cual se le agregaron 20 µL del extracto a distintas concentraciones (1-4 mg/mL), las cuales se evaluaron por triplicado. Se incubó durante 30 min en la oscuridad y posteriormente se leyó a 593 nm en un espectrofotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO. Como control (+) se utilizó al TROLOX (derivado de vitamina E) y como (-) el metanol.

### 3.6. Actividad antibacteriana

#### 3.6.1. Método de microdilución en caldo

Los ensayos *in vitro* de actividad antibacteriana se realizaron mediante el método de microdilución en caldo. Se depositaron 200 µL por triplicado en placas de 96 pozos, cada una de las diluciones de los extractos etanólicos (10000 hasta 5000 µg/mL); luego se adicionaron 15 µL de una suspensión de cultivo bacteriano en fase logarítmica de 10<sup>8</sup> UFC/ml, la turbidez de esta suspensión bacteriana coincide con la turbidez del estándar 0.5 de McFarland. Se utilizó 12 µg/mL de gentamicina como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano. Además, también incluyó pocillos que contenían el medio de cultivo más DMSO (0.2–0.8 %), con el fin de obtener un control del efecto antibacteriano del disolvente. Después de la inoculación, la placa se incubó a 37 °C por 24 h (Velazquez *et al.*, 2007). El efecto de los extractos de *Ganoderma* se determinó mediante recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC), los resultados se expresaron en unidades de log UFC/mL. Se tomaron 50 µL de los pozos con los diferentes tratamientos y se hicieron diluciones en serie diez veces mayores (1:10) en NaCl (0.85 %, p/v). A continuación, se sembraron 10 µl de cada dilución en placas de agar e incubaron a 30 °C durante 24 h. Se enumeraron las colonias y luego se determinó el log UFC/mL, con el cual se calculó el MIC<sub>50</sub>.

## 3.7. Compuestos fenólicos

### 3.7.1. Contenido de Fenoles Totales

La concentración de fenoles totales en extractos etanólicos de las especies de *Ganoderma* estudiadas se midió por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de oxido-reducción; el agente oxidante fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de extractos a una concentración de 1 mg/mL con 80  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 40  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu 0.25 N, 60  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (5 % en agua destilada) y 80  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Las mezclas se incubaron a TA durante 1 h, luego se leyó la absorbancia de las muestras a 750 nm en un espectrofotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g extracto) (López *et al.*, 2018).

### 3.7.2. Contenido de Flavonoides Totales

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio. Se mezclaron 28  $\mu\text{L}$  de extracto con 120  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 9  $\mu\text{L}$  de nitrito de sodio (5, p/v) en las placas de 96 pocillos. Después de 5 min, se añadieron 9  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de aluminio (10, p/v) y la mezcla se dejó reposar durante 5 min. Finalmente, se añadieron 120  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio (0.5 M) y se incubó durante 30 min a TA protegido de la luz. La absorbancia de las muestras se leyó a 510 nm en un espectrofotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de Quercetina (mg EQ/g extracto) (Mercado *et al.*, 2015).

## 3.8. Análisis Estadísticos

Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANDEVA), seguido de la prueba HSD de Tukey con  $\alpha=0.05$ . Se utilizó el software estadístico JMP® Pro 14.0.0.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Obtención de los extractos etanólicos

Los extractos etanólicos de los basidiomas de *G. subincrustatum*, *G. weberianum*, *G. lucidum* y *G. oerstedii*, se obtuvieron por la técnica de maceración con algunas modificaciones; generando rendimientos de extracción y cantidad de extracto en promedio de 5.33 % y 0.54 g, a partir de 10 g de muestra pulverizada, rendimiento superior a los obtenidos (Obiol, 2016) de 4.5 % con basidiomas de *G. lucidum*. A partir de dichos extractos se prepararon los stocks para evaluar las diferentes actividades biológicas.

En **anexo A** se muestran los 8 tratamientos de extracción con las relaciones masa-solvente y tiempos establecidos en el diseño estadístico y los porcentajes de extracción obtenido para cada uno de ellos. Los resultados del ANDEVA se muestran en la **Tabla 3**; se observa que el modelo completo de segundo orden es significativo ( $p < 0.05$ ), por lo que se rechaza la hipótesis nula Ec. (2). La  $R^2 = 0.97$  es altamente significativa; la  $R^2$  ajustada = 0.96 nos indica que el modelo explica el 96 % de lo ocurrido experimentalmente, lo que indica un ajuste adecuado.

$$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \beta_{11} = \beta_{22} = \beta_{12} = 0 \quad (2)$$

**Tabla 3.** Resultados de ajuste y análisis de varianza del diseño en estudio.

<b>Resumen del ajuste</b>				
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9748			
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.9657			
<b>Raíz del error cuadrático medio</b>	0.1472			
<b>Media de respuesta</b>	6.5850			
<b>Observaciones (o suma de pesos)</b>	16			
<b>Análisis de varianza</b>				
<b>Fuente</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Media de los cuadrados</b>	<b>Razón F</b>
<b>Modelo</b>	4	9.2494	2.3123	106.5908
<b>Error</b>	11	0.2386	0.0216	Prob > F
<b>C. Total</b>	15	9.4880		<.0001
<b>Falta de ajuste</b>				
<b>Fuente</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Media de los cuadrados</b>	<b>Razón F</b>
<b>Falta de ajuste</b>	3	0.1502	0.0500	4.5293
<b>Error puro</b>	8	0.0884	0.0110	Prob > F
<b>Error total</b>	11	0.2386		0.0389
				R cuadrado máximo
				0.9907

**Tabla 4.** Parámetros estimados de las extracciones etanólicas

<b>Estimación de parámetros</b>				
<b>Término</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Razón t</b>	<b>Prob &gt;  t </b>
<b>Constante del modelo</b>	6.9924	0.0695	100.53	<.0001
<b>X1 (masa-solvente)</b>	0.4630	0.0375	12.33	<.0001
<b>X2 (tiempo)</b>	0.7336	0.0467	15.69	<.0001
<b>X1*X2</b>	0.0659	0.0467	1.41	0.1861
<b>X2*X2</b>	-0.4542	0.0910	-4.99	0.0004

En la **Tabla 4** se presentan los parámetros del modelo de segundo orden, estimado para los datos de porcentaje de extracción Ec. (3):

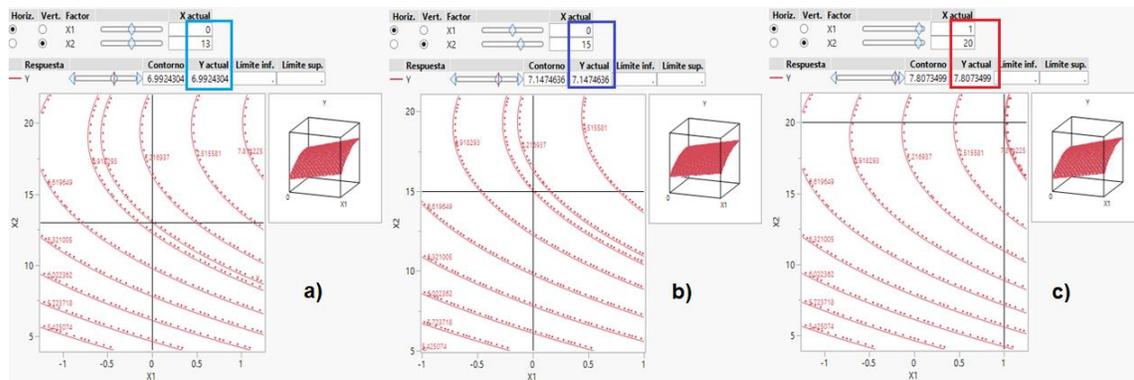
$$Y = 6.99 + 0.46x_1 + 0.73x_2 - 0.45x_2^2 + 0.066x_1x_2 \quad (3)$$

En la **Tabla 5** se observa que el tiempo y la relación masa-solvente es significativo ( $p < 0.0001$ ) y la multiplicación de estos factores no lo es ( $p = 0.1881$ ). Otro efecto significativo en el porcentaje de extracción es el término cuadrático del tiempo con un ( $p = 0.0004$ ).

**Tabla 5.** Análisis de los efectos para las extracciones.

Pruebas de efectos					
Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
<b>X1 (masa/solvente)</b>	1	1	3.3001	152.1255	<.0001
<b>X2 (tiempo)</b>	1	1	5.3400	246.1553	<.0001
<b>X1*X2</b>	1	1	0.0431	1.9892	0.1861
<b>X2*X2</b>	1	1	0.5404	24.9144	0.0004

En la **Figura 6** se muestran las gráficas de contornos con diferentes valores de los factores X1 y X2. Al utilizar la opción maximizar deseabilidad, se obtiene un máximo de la variable respuesta en ( $X1=1$ ) y ( $X2=20$ ) con un porcentaje de extracción de 7.80.

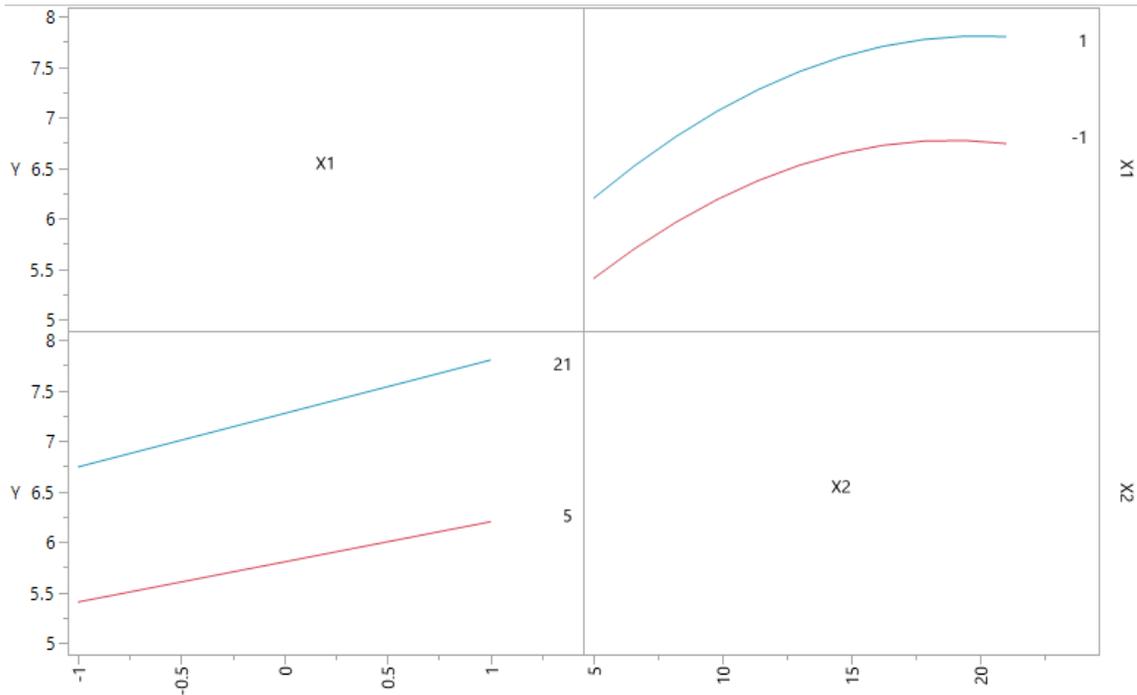


**Figura 6.** Gráficos de contorno en parámetros de X1 y X2 decodificados en relación masa/solvente y tiempo: a) 1/40 y 13 días; b) 1/40 y 15 días; c) 1/50 y 20 días.

Analizando los resultados de la variable respuesta en los tres casos expuestos en la **Figura 6**, no se registró diferencia significativa respecto a los tres valores de porcentaje de extracción: a) 6.99; b) 7.15 y c) 7.80. Las condiciones de relación masa/solvente y tiempo en las que se obtiene el máximo de porcentaje de extracción no son las óptimas. Con este estudio se registró la influencia que tienen las variables tiempo y relación

masa/solvente sobre el rendimiento de extracción, en cuanto a la relación masa/solvente el autor (Voigt, 1982) planteó “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento”.

En cuanto al tiempo de extracción distintos autores prescriben que oscilan entre 4 y 10 días donde se alcanza el máximo de extracción, esto se puede apreciar en la **Figura 7**; la variable X2 (tiempo) no presenta un comportamiento lineal como la variable X1 (masa/solvente). Es una curva que tiende a una meseta de estabilización en determinado tiempo donde se alcanza el máximo, como se observa a partir de ese punto la variable respuesta no varía, lo que indica una saturación del solvente. Según la relación masa/solvente será el tiempo en que ocurra esta saturación.



**Figura 7.** Perfil de interacciones de las variables en estudio: masa/solvente (X1), tiempo (X2) y porcentaje de extracción (Y).

Con el análisis de los resultados antes expuestos se propone mejorar los porcentajes de extracción del método de maceración; la solución del caso b) en la **Figura 6**: relación masa/solvente de (1/40) y tiempo de extracción 15 días. (Gao *et al.*, 2011) realizaron un

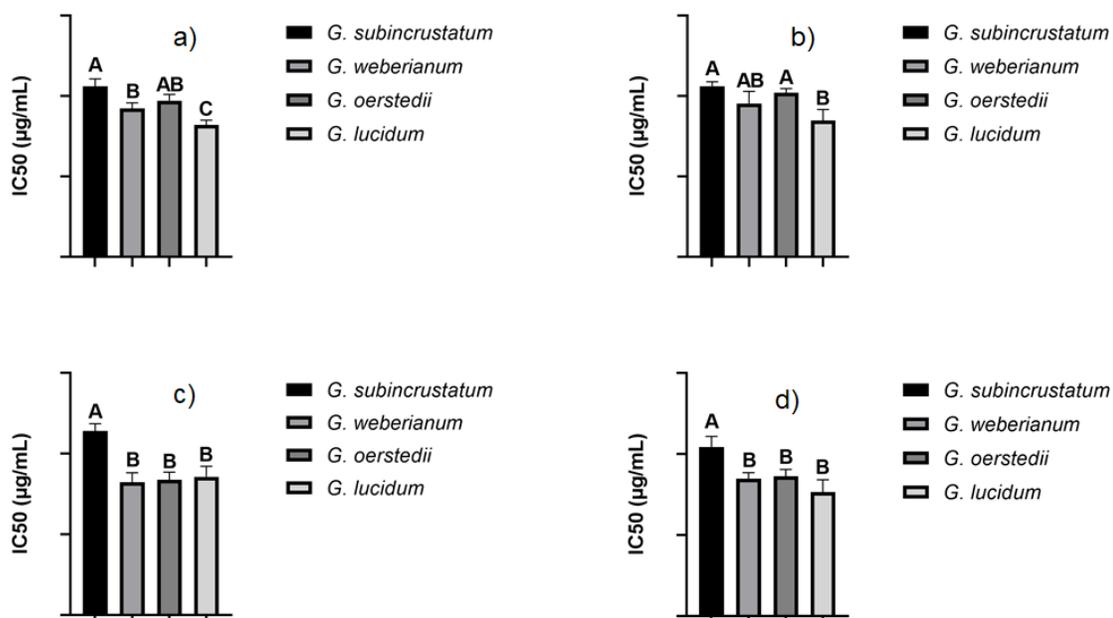
estudio y optimizaron el proceso de extracción de triterpenos de *Ganoderma*, reportando resultados similares en la relación masa/solvente, siendo óptimo 1/35 m/v.

Para optimizar el proceso de maceración utilizado en este proyecto es necesario plantear otro diseño de experimentos, considerando el tamaño de partícula, mientras más pequeña, aumenta el área de contacto y disminuye el tiempo de extracción; otra variable la agitación, la cual otorga una mayor eficiencia en la extracción debido a que disminuye la resistencia a la difusión, eliminando la película de fluido que cubre la superficie del sólido en reposo.

## 4.2. Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los extractos etanólicos de basidiomas de las especies de *Ganoderma*: *G. oerstedii*, *G. weberianum*, *G. subincrustatum* y *G. lucidum* se evaluó por el ensayo estandarizado MTT, sobre las líneas celulares MDA (epitelio humano de cáncer de mama), A549 (carcinoma de pulmón humano), HeLa (carcinoma de cuello uterino humano) y ARPE-19 (epitelio pigmentado de retina). Los valores de IC<sub>50</sub> se calcularon mediante regresión lineal con el paquete estadístico de Microsoft Excel.

Los resultados mostrados en la **Figura 7** y **Tabla 6** revelan que los extractos etanólicos de las especies de *Ganoderma* tienen actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares evaluadas. El extracto de *G. subincrustatum* presentó menor actividad con un IC<sub>50</sub>>100 µg/mL contra todas las líneas celulares; los extractos de *G. weberianum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum* mostraron similar actividad inhibidora contra las líneas celulares de cáncer MDA, A549 y HeLa, con valores de IC<sub>50</sub> < 100 µg/mL. La línea celular de control Arpe-19 fue afectada por los extractos, por lo que la actividad antiproliferativa no indicó selectividad sobre las líneas celulares cancerosas.



**Figura 8.** Diagramas de los IC<sub>50</sub> de los extractos etanólicos de *Ganoderma*: a) línea celular MDA, b) A549, c) HeLa y d) Arpe-19. Tratamiento no indicados con la misma letra son significativamente distintos.

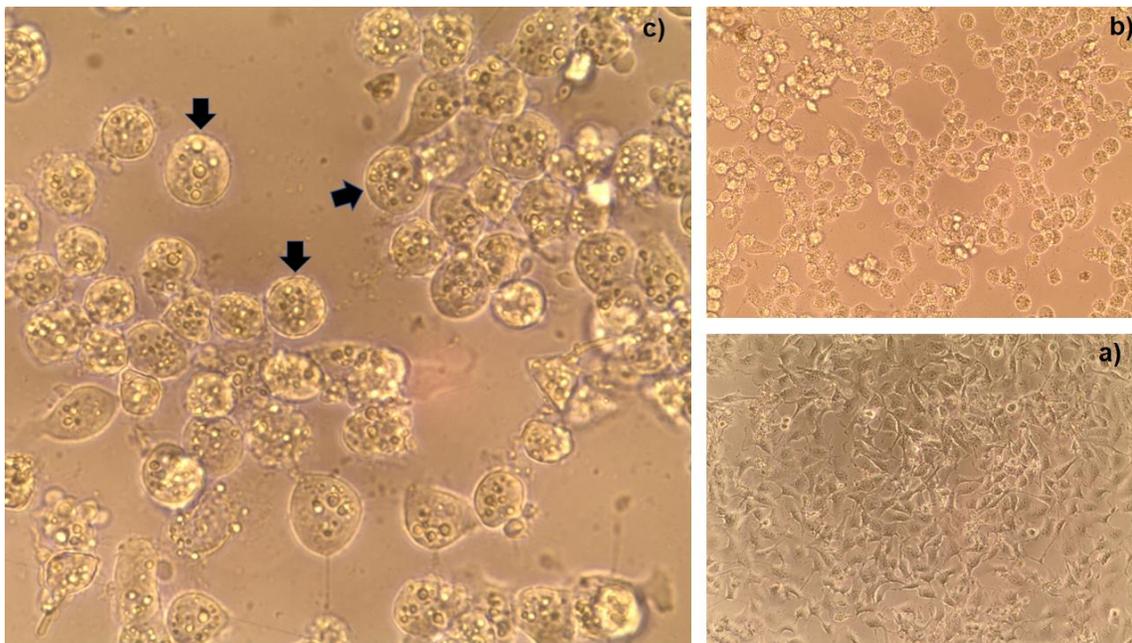
**Tabla 6.** IC<sub>50</sub> (µg/mL) de los extractos etanólicos de las especies de *Ganoderma* en las diferentes líneas celulares estudiadas.

Extracto etanólicos	IC <sub>50</sub> ± DE			
	MDA <sup>a</sup>	A549 <sup>a</sup>	HELA <sup>a</sup>	ARPE-19 <sup>a</sup>
<i>G. subincrustatum</i>	114.09 ± 4.5	104.43 ± 6.5	106.03 ± 4.7	106.20 ± 2.7
<i>G. weberianum</i>	82.33 ± 5.8	84.98 ± 3.6	92.27 ± 3.5	95.41 ± 7.5
<i>G. oerstedii</i>	83.81 ± 5.7	86.33 ± 4.6	97.15 ± 7.3	102.01 ± 6.6
<i>G. lucidum</i>	85.68 ± 6.5	76.48 ± 7.4	82.09 ± 2.9	84.84 ± 6.7

Autores como (López, 2016) reportan un IC<sub>50</sub> < 25 µg/mL para extracto etanólicos de *G. subincrustatum* sobre líneas celulares HeLa y A549; así como valores de 57.7 y 42.8 µg/mL respectivamente, con extractos de *G. weberianum*. (Liu *et al.*, 2009) determinaron un IC<sub>50</sub> de 71.6 µg/mL para extractos etanólicos de *G. lucidum* sobre la línea celular MDA y (Ćilerdžić *et al.*, 2014) registraron para extractos etanólicos de una cepa comercial de *G. lucidum* IC<sub>50</sub> de 54,81 y 92,98 µg/mL sobre las líneas celulares HeLa y A549 respectivamente. La actividad antiproliferativa en especies de *Ganoderma* es atribuida

principalmente a triterpenoides del tipo lanostano presentes en cuerpos fructíferos (Trigos y Suárez, 2011b; López, 2016); sin embargo, la disponibilidad de estos compuestos bioactivos depende de cada especie y el medio en que se cultive (López, 2016). La actividad de los triterpenoides se relaciona con su estructura y como ocurre con todo extracto, es difícil reconocer el principal elemento biológicamente activo, responsable de los efectos farmacológicos observados (Tang *et al.*, 2006).

Durante el monitoreo de los ensayos por medio de microscopio óptico, se observó que a las 24 h los extractos en concentraciones de 200  $\mu\text{g/mL}$ , inducen la formación de vesículas **Figura 9**, cambios morfológicos observados en todas las líneas celulares de una manera dependiente de la dosis y del extracto **anexo B**; a las 48 h se observan gran cantidad de detrito celular (restos de células muertas), células con características morfológicas típicas de apoptosis, la formación de ampollas en la membrana y células en estado de suspensión.



**Figura 9.** Morfología línea celular Hela, 24 h de aplicado el tratamiento: a) Control; b) Extracto *G. weberianum* (200  $\mu\text{g/mL}$ ), Aumento (20X); c) Extracto *G. weberianum* (200  $\mu\text{g/mL}$ ), Aumento (40X).

Los extractos etanólicos de especies de *Ganoderma* inhibieron la proliferación celular y los cambios morfológicos observados indican que inducen tanto la apoptosis como la muerte celular autofágica. Los ácidos ganodéricos son unos de los triterpenodes más activos presente en las especies de *Ganoderma*, su contenido es mayor en cepas silvestres que en comerciales (Ramírez, Guevara y Rodríguez, 2020). Estudios han documentado que el ácido ganodérico D puede inhibir la proliferación celular a través de la vía mTOR en carcinoma de células escamosas de esófago (ESCC) e inducir apoptosis sinérgica y muerte celular autofágica al interrumpir el flujo autofágico (Shao *et al.*, 2020). Otras investigaciones reportan que el ácido ganodérico DM activa la apoptosis autofágica en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) humano A549 y NCI-H460, actuando por el mismo mecanismo molecular (Xia *et al.*, 2020). La interacción entre la apoptosis y la autofagia se ha estudiado y se han identificado varios reguladores comunes. Las proteínas relacionadas con la apoptosis como las proteínas de la familia Bcl-2, las proteínas de la familia p53 y caspasa, y las proteínas relacionadas con la autofagia como ATG3/5/7 y mTOR pueden tener funciones mutuas tanto en la apoptosis como en la autofagia (Melkonyan *et al.*, 1997; Klionsky *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2019).

### 4.3. Evaluación de la producción de ON

Se evaluó la sensibilidad de las células RAW 264.7 a los extractos etanólicos de *G. subincrustatum*, *G. weberianum* *G. oerstedii* y *G. lucidum* mediante el método MTT después de incubar las células durante 24 h con diversas concentraciones de los extractos (200-12.5 µg / mL) en presencia o ausencia de LPS, la viabilidad celular se afectó hasta un 20 % en la concentración de 50 µg/mL. Por tanto, se utilizaron las concentraciones (25, 12.5, 6.2 y 3.1 µg/mL) para evaluar el efecto de los extractos etanólicos en la producción de ON como se observa en la **Figura 10**; el rango de concentraciones no afecta la viabilidad celular manteniéndose superior al 90 %.

El ON es un mediador fisiológico clave de muchos procesos, que juega un papel crucial en el proceso inflamatorio (Coleman, 2001; Guzik, Korbut y Adamek, 2003), y su sobreproducción induce inflamación y se convierte en la patogenia de la inflamación

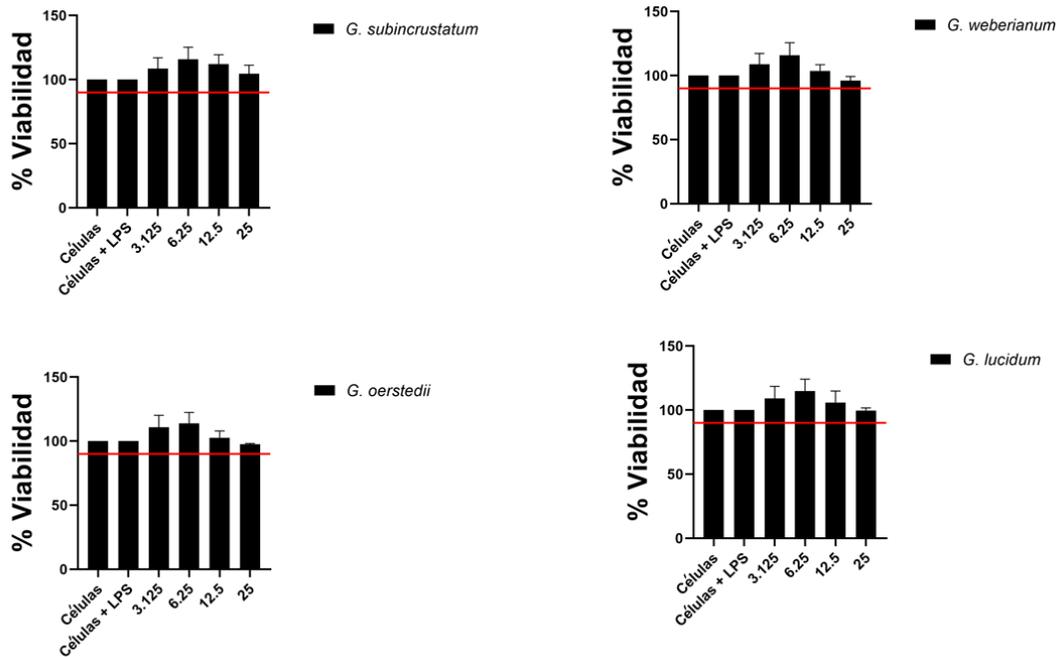
tanto aguda como crónica (Shanley *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2007). Los efectos de los extractos de *Ganoderma* sobre la producción de ON se evaluaron utilizando el reactivo de Griess. Como resultado **Figura 11**, la estimulación con LPS mejoró la liberación de ON en las células RAW 264.7 en comparación con las células no estimuladas; sin embargo, el tratamiento con los extractos de *Ganoderma* inhibió significativamente la liberación de ON en células estimulada por LPS de una manera dependiente de la dosis. El mayor efecto se observó en la concentración más alta (25 µg/mL), donde la producción de ON se disminuyó en un 60 % con los tratamientos de extractos *G. subincrustatum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum*. Como se observa en la **Tabla 7** no hay diferencia significativa en cuanto al IC<sub>50</sub>. Por otro lado, una concentración igual de los extractos de *G. weberianum* redujo la producción de ON en un 47 %.

**Tabla 7.** IC<sub>50</sub> (µg/mL) de los extractos etanólicos de las especies de *Ganoderma* sobre la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7.

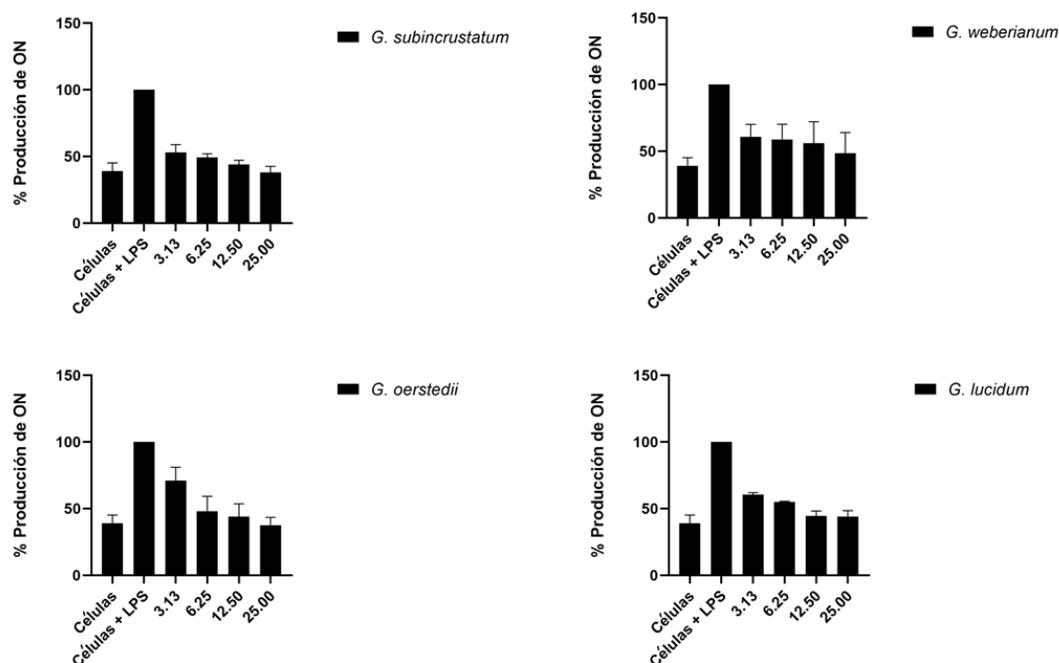
Extracto etanólicos	IC <sub>50</sub> ± SD
<i>G. subincrustatum</i>	5.42 ± 2.3 <sup>b</sup>
<i>G. weberianum</i>	22.67 ± 4.6 <sup>a</sup>
<i>G. oerstedii</i>	7.11 ± 2.9 <sup>b</sup>
<i>G. lucidum</i>	7.81 ± 3.8 <sup>b</sup>
Tratamientos no indicados con la misma letra son significativamente distintos	

El ON es sintetizado a partir de la L-arginina por el óxido nítrico sintasa (NOS), el nivel de expresión de la isoforma inducible de esta enzima (iNOS) permite que las células liberen grandes cantidades de ON, por lo que la reducción del nivel de ON mediante la regulación de la expresión génica de iNOS se considera una estrategia prometedora para la terapia de la inflamación (Bogdan, 2001; Figueroa *et al.*, 2008). Estudios recientes (Xu *et al.*, 2021) reportaron que los esteroides de *G. lucidum* inhiben la sobreproducción de ON en células RAW 264.7 estimulada por LPS, incluida la sobreexpresión de genes inflamatorios como iNOS. Además, indicaron que la actividad antiinflamatoria estaba mediada por las rutas de señalización de p38 MAPK y NF-κB. Un estudio anterior (Hasnat *et al.*, 2015) había demostrado que extractos acuosos de *G. lucidum* cultivado en arroz integral suprimía la producción de ON en macrófagos estimulados por LPS y disminuyó la expresión de TNF-α e iNOS; también inhibió la

activación de p38, ERK, JNK, MAPK y el factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B). Estos resultados sugieren que las moléculas bioactivas como esteroides, polisacáridos y triterpenos presentes en especies de *Ganoderma* pueden ejercer un efecto antiinflamatorio sinérgico a través de diferentes mecanismos.



**Figura 10.** Efecto citotóxico de los extractos etanólicos de *Ganoderma* sobre la línea Celular RAW 264.7



**Figura 11.** Efecto de los extractos etanólicos de *Ganoderma* sobre la producción de óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7 activadas con LPS.

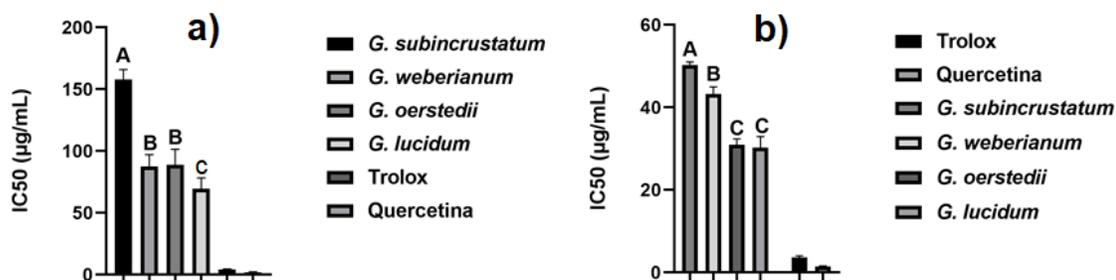
#### 4.4. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *G. subincrustatum*, *G. weberianum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum* se evaluaron por los ensayos DPPH, ABTS y FRAP. Los resultados se reportan como  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) y como equivalentes de Trolox por gramo de muestra ( $\mu\text{mol ET/g}$  muestra). Los valores de  $IC_{50}$  se obtuvieron por medio de un modelo farmacodinámico Ec. (1) (Zou *et al.*, 2020), utilizando la función  $n\text{lnfit}$  del software Matlab R2015b (**Anexo C**). El modelo se ajustó a los datos experimentales y describe bien la relación dosis-respuesta; es decir, existe una relación directa entre la concentración de los extractos y su actividad antioxidante.

**Tabla 8.** IC<sub>50</sub> de los extractos etanólicos de las especies de *Ganoderma* de los ensayos DPPH y ABTS

	IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± DE	
	DPPH	ABTS
<b>Trolox</b>	4.05 ± 0.6	3.61 ± 0.4
<b>Quercetina</b>	1.85 ± 0.4	1.41 ± 0.2
<b><i>G. subincrustatum</i></b>	157.91 ± 8.0 <sup>a</sup>	50.28 ± 0.7 <sup>a</sup>
<b><i>G. weberianum</i></b>	87.37 ± 7.6 <sup>b</sup>	43.21 ± 1.7 <sup>b</sup>
<b><i>G. oerstedii</i></b>	88.78 ± 9.6 <sup>b</sup>	30.99 ± 1.4 <sup>c</sup>
<b><i>G. lucidum</i></b>	69.39 ± 8.7 <sup>c</sup>	30.25 ± 2.7 <sup>c</sup>

Tratamientos no indicados con la misma letra son significativamente distintos

**Figura 12.** Gráficos de barra de los IC<sub>50</sub> de los extractos etanólicos de las especies de *Ganoderma*: a) DPPH y b) ABTS. Tratamientos no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

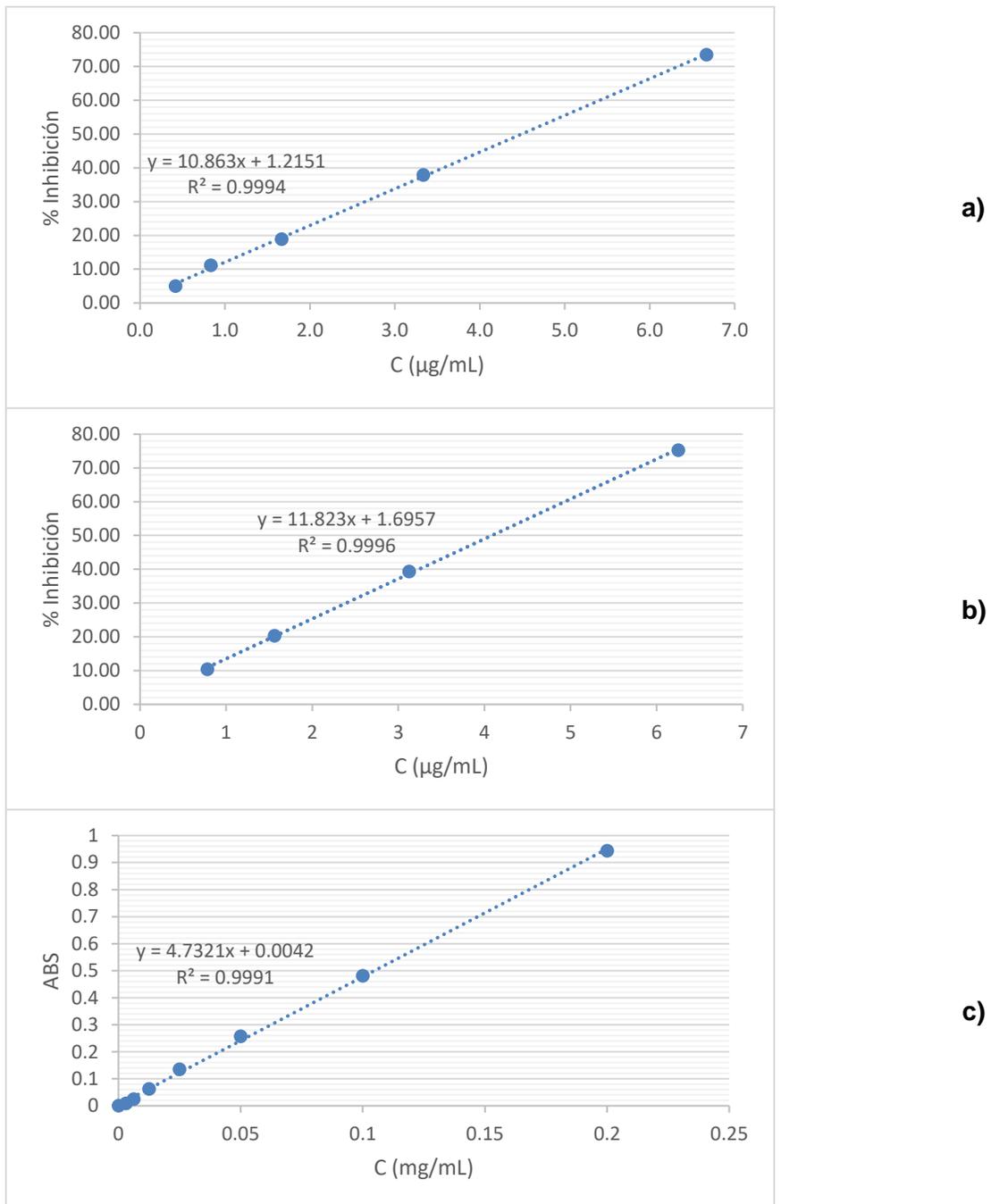
En la **Tabla 8** y **Figura 12** se muestran los resultados de IC<sub>50</sub> calculados por el modelo ajustado a los datos obtenidos por los ensayos DPPH y ABTS. Los valores de IC<sub>50</sub> encontrados en la literatura para el Trolox y la Quercetina, obtenido en métodos DPPH y ABTS son variables, debido a que dependen de las condiciones de trabajo. (Kicel y Wolbiś, 2013) reportan valores 4.1 y 1.9 para el Trolox y Quercetina en ensayo DPPH; mientras que (Galvez *et al.*, 2021), 2.48 y 2.99 µg/mL para el Trolox en DPPH Y ABTS respetivamente. Los resultados para los estándares de control obtenidos en este trabajo se encuentran dentro del rango reportado en la literatura, por lo que podemos plantear que la metodología utilizada es adecuada y los resultados confiables.

Teniendo en cuenta que un bajo  $IC_{50}$ , está directamente relacionado con una alta actividad antioxidante (Zhu *et al.*, 2011), varios autores han reportado criterios de selección para los extractos vegetales con base al  $IC_{50}$ , considerando de alto potencial antioxidante aquellos con valores  $<30 \mu\text{g/mL}$ , con moderado potencial en un rango entre  $30\text{-}100 \mu\text{g/mL}$  y de bajo potencial antioxidante aquellos con un  $IC_{50}$  por encima de  $100 \mu\text{g/mL}$  (Ramos *et al.*, 2003). Según estos criterios, los extractos etanólicos de *Ganoderma* presentaron moderado potencial antioxidante, excepto el extracto de *G. subincrustatum* con un  $IC_{50}>100 \mu\text{g/mL}$  por el método DPPH. Los extractos de *G. weberianum* y *G. oerstedii* no mostraron diferencias significativas; *G. lucidum* presentó la mayor inhibición de radicales DPPH. Por el método de ABTS, los extractos de *G. oerstedii* y *G. lucidum* mostraron similar actividad con  $IC_{50}= 30 \mu\text{g/mL}$ .

Los  $IC_{50}$  obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos fueron significativos, principalmente para valores determinados a través del método de ABTS en donde todos los resultados son menores comparados con DPPH. Este comportamiento sugiere que en el extracto se encuentran presentes compuestos antioxidantes tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica que pueden estabilizar el radical catiónico (Tovar del Rio, 2013). Estos datos son consistentes con los reportados por (Pérez *et al.*, 2016) para extractos etanólicos de *Ganoderma* sp, con valores de  $IC_{50}= 85,63 \mu\text{g/mL}$  y  $62,28 \mu\text{g/mL}$  mediante los métodos DPPH y ABTS respectivamente. Los polisacáridos de extractos de *G. applanatum* y *G. lucidum* tuvieron un  $IC_{50}<100 \mu\text{g/mL}$  (Kozarski *et al.*, 2012).

Las diferencias entre los dos ensayos de captura de radicales libres se debe a que las condiciones de reacción y cinética son disímiles. El radical libre DPPH es estable en su formación por fácil disolución en metanol. En contraste, el radical catión ABTS se crea por reacción entre el ABTS con el oxidante, persulfato de potasio, lo cual lo hace menos estable y más transitorio (Alam, Bristi y Rafiqzaman, 2013).

Para expresar los resultados como capacidad antioxidante equivalentes de Trolox se utilizaron las curvas del estándar Trolox en los ensayos DPPH, ABTS y FRAP, utilizándose el rango de concentración donde la curva presentaba comportamiento lineal, como se muestra en la **Figura 13** con un buen ajuste con ( $R^2 = 0.999$ ).

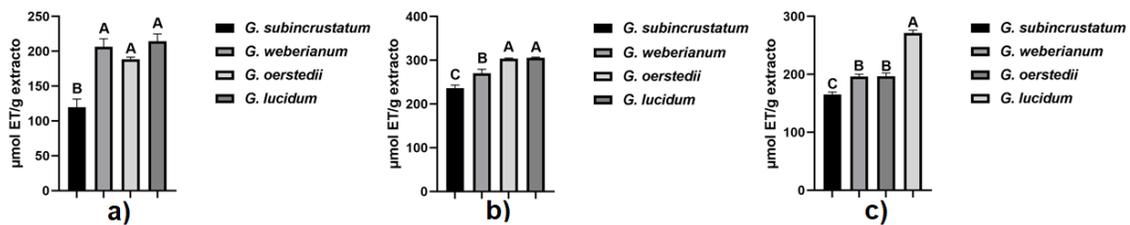


**Figura 13.** Curvas del estándar Trolox: a) DPPH, b) ABTS y c) FRAP.

**Tabla 9.** Capacidad antioxidante expresada en equivalentes de Trolox

	$\mu\text{mol ET/g muestra} \pm \text{DE}$		
	DPPH	ABTS	FRAP
<i>G. subincrustatum</i>	119.76 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	236.52 $\pm$ 6.5 <sup>c</sup>	165.02 $\pm$ 4.3 <sup>c</sup>
<i>G. weberianum</i>	206.38 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>	270.35 $\pm$ 9.1 <sup>b</sup>	196.35 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>
<i>G. oerstedii</i>	188.56 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	303.69 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	196.92 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>
<i>G. lucidum</i>	214.54 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	305.79 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	271.11 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>

Tratamientos no indicados con la misma letra son significativamente distintos

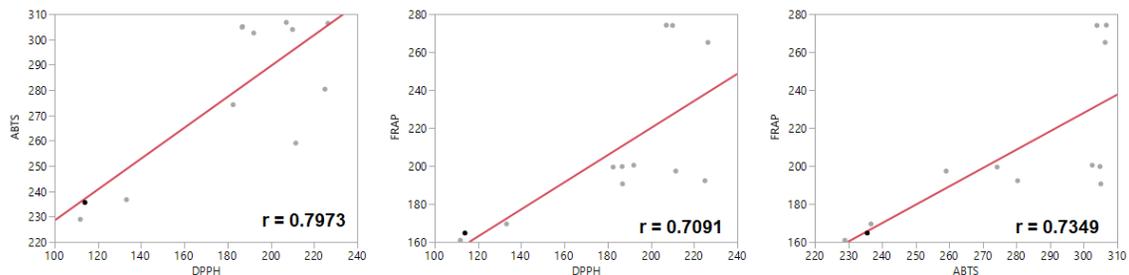
**Figura 14.** Capacidad antioxidante expresada en equivalentes de Trolox: a) Ensayo DPPH, b) Ensayo ABTS y c) Ensayo FRAP. Tratamientos no indicados con la misma letra son significativamente distintos

En la **Tabla 9** y **Figura 14** se muestran la actividad antioxidante de los extractos de etanólicos de *Ganoderma*, obtenidos mediante los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP expresada en equivalentes de Trolox a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  para DPPH y ABTS; 2  $\text{mg/mL}$  de extracto para el ensayo de FRAP.

Para el ensayo DPPH se puede observar que los extractos etanólicos más destacados por sus concentraciones altas de equivalentes Trolox son *G. oerstedii*, *G. weberianum* y *G. lucidum* con similar actividad ( $P > 0.05$ ), con valores de 188.56, 206.38 y 214.54  $\mu\text{mol ET/g}$  de extracto, respectivamente. En el ensayo ABTS, los extractos etanólicos que presentaron las concentraciones más relevantes en equivalentes trolox al igual que para el ensayo DPPH fueron *G. oerstedii* y *G. lucidum* con valores de 303.6 y 305.7  $\mu\text{mol ET/g}$  de extracto. En el ensayo FRAP, el extracto etanólico de *G. lucidum* mostró la concentración más destacada en equivalentes Trolox con valor de 271.1  $\mu\text{mol ET/g}$  de

extracto; mientras que los extractos de *G. oerstedii* y *G. weberianum* con actividad similar. El extracto de *G. subincrustatum* indicó la menor actividad en todos los ensayos. Resultados similares reporto (Pérez *et al.*, 2016) para extractos etanólicos de basidiomas de *Ganoderma* sp, expresada en equivalentes de Trolox con valor de 229,65  $\mu\text{mol ET/g}$  de extracto, obtenido por los métodos DPPH y ABTS.

Se encontró una alta correlación entre los ensayos (DPPH, ABTS y FRAP), tal como se observó en otras investigaciones (Heleno *et al.*, 2012), con un coeficiente de correlación ( $r$ )>0.7 (**Figura 15**), lo cual muestra que los extractos etanólicos de *Ganoderma* evaluados tienen actividades comparables por los métodos utilizado y por tanto, reproducibles.



**Figura 15.** Correlación entre los equivalentes Trolox de los extractos etanólicos de *Ganoderma* para los ensayos DPPH, ABTS y FRAP.

#### 4.5. Actividad antibacteriana

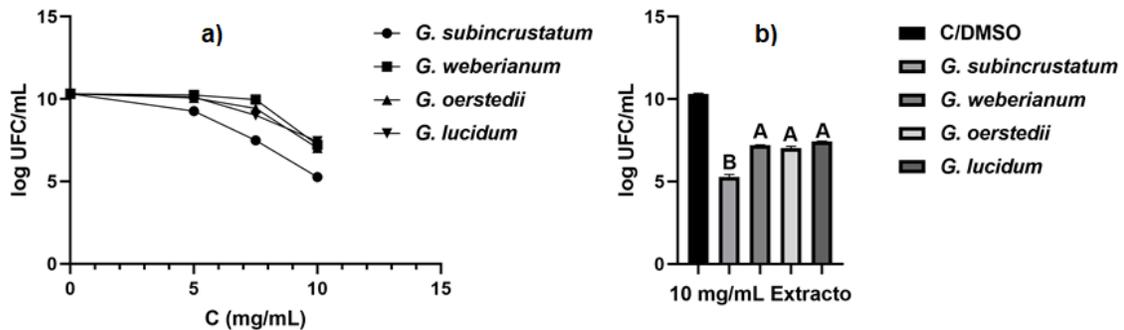
La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *G. subincrustatum*, *G. weberianum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum*, se determinó mediante la técnica de Microdilución en caldo, utilizando placas de 96 pocillos. Se presentaron dificultades de solubilidad de los extractos en el caldo Müller Hinton, formando un precipitado en el fondo del pozo, imposibilitando la lectura en el espectrofotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO. Como alternativa se sembraron cada una de las diluciones en placas de agar y se determinó el número de UFC (Unidades formadoras de colonias/ml), con el cual se definió el MIC<sub>50</sub>. Como se muestra en la **Tabla 10** ninguno de los extractos

etanólicos de *Ganoderma* presentó resultados positivos frente a la bacteria *Escherichia coli* a ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que sobre *Staphylococcus aureus* se observó una actividad antibacteriana débil con un  $MIC_{50} > 10$  mg/mL.

**Tabla 10.**  $MIC_{50}$  de los extractos etanólicos de *Ganoderma* sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (NA: No activo)

Extracto	$MIC_{50}$ (mg/mL)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. subincrustatum</i>	>10	NA
<i>G. weberianum</i>	>10	NA
<i>G. oerstedii</i>	>10	NA
<i>G. lucidum</i>	>10	NA

Como se observa en la **Figura 16a**, los extractos etanólicos redujeron la viabilidad de *Staphylococcus aureus* con el aumento de la concentración. Los extractos de *G. weberianum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum* mostraron similar actividad con un 30% de inhibición ( $P > 0.05$ ) (**Figura 16b**), destacándose el extracto de *G. subincrustatum* con un 49 %.



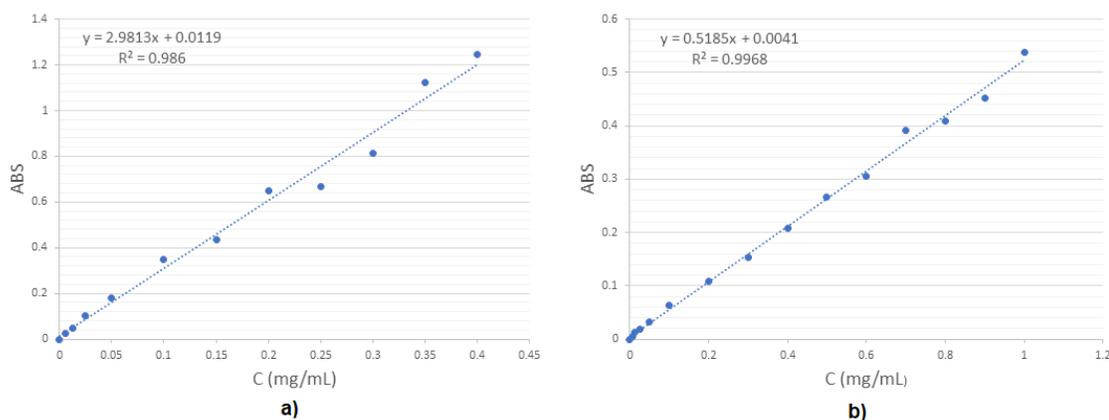
**Figura 16.** Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Ganoderma* ante *Staphylococcus aureus*: a) Efecto de los extractos sobre la viabilidad, b) Diagrama de barra de los extractos en la concentración más alta evaluada.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones, donde los extractos de especies de *Ganoderma* no presentaron actividad sobre *Escherichia coli* y si una débil actividad sobre *Staphylococcus aureus* (Guzmán *et al.*, 2013; Zengin *et al.*, 2015; Solórzano, 2017). Otros estudios reportan actividad antibacteriana de extractos

*G. lucidum* sobre bacterias Gram (+) y (-) como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, con valores de MIC de 2.7 y 2.0 mg/mL respectivamente (Ćilerdžić *et al.*, 2014). Del mismo modo (Li *et al.*, 2012), informaron que el extracto de *G. atrum* reveló actividad antibacteriana contra las bacterias analizadas y los valores de MIC se encontraban 3.1 a 25 mg/mL. (Kosanić y Ranković, 2011) demostraron que las bacterias Gram (+) son más susceptibles a varios extractos de hongos que las bacterias Gram (-), debido a la ausencia de lipoproteínas en la pared celular. (Turkoglu *et al.*, 2007) reportaron que los fenoles presentes en los extractos de hongos son los principales portadores de actividad antibacteriana.

#### 4.6. Compuestos Fenólicos

La determinación de los fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos de *G. subincrustatum*, *G. weberianum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum* se realizaron por el método de Folin-Ciocalteu y método colorimétrico de cloruro de aluminio. Los resultados se reportan como equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g extracto) y equivalentes de quercetina (mg EQ/g extracto) para una concentración de 1 mg/mL respectivamente. Se realizó las curvas de los estándares de ácido gálico para los fenoles y de quercetina para los flavonoides (**Figura 17**).



**Figura 17.** Curva de los estándares: a) ácido gálico para fenoles totales  $R^2=0.98$ , b) quercetina para flavonoides totales  $R^2=0.99$ .

En la **Tabla 11** se presenta el contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de *Ganoderma*.

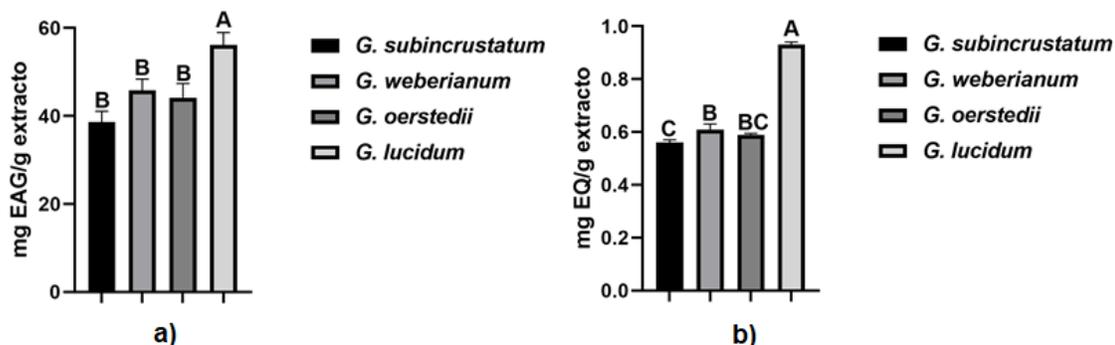
**Tabla 11.** Contenidos totales de fenoles y flavonoides en los extractos etanólicos de *Ganoderma*.

Extracto	Fenoles Totales mg EAG/g extracto	Flavonoides Totales mg EQ/g extracto
<i>G. subincrustatum</i>	38.61 ± 2.4 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.01 <sup>b</sup>
<i>G. weberianum</i>	45.8 ± 2.6 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.02 <sup>b</sup>
<i>G. oerstedii</i>	44.16 ± 6.2 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.005 <sup>bc</sup>
<i>G. lucidum</i>	56.19 ± 2.8 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.01 <sup>a</sup>
Tratamientos no indicados con la misma letra son significativamente distintos		

El contenido de fenoles totales para los extractos etanólicos de *Ganoderma* varía entre 38.6 ± 2.4 y 56.1 ± 2.8 mg EAG/g extracto. Se observa que el extracto etanólico de *G. lucidum* presento el mayor contenido de fenoles totales y en los demás extractos sin diferencias significativa (**Figura 18a**). Estos resultados son consistentes con los reportados por diferentes autores como (Heleno *et al.*, 2012) para extractos fenólicos y polisacarídicos de cuerpos fructíferos de *G. lucidum*, donde el contenido de fenoles totales se encontraba de 28.6-55.5 mg EAG/g extracto; para extractos de etanólicos crudo 60.7 mg EAG/g extracto (Roseta *et al.*, 2017) y para extracto etanólico de *G. curtisii* con 49.1 mg EAG/g extracto (Ivone, 2015). Otro estudio realizado por (Obodai *et al.*, 2017) con 12 cepas silvestres de *Ganoderma* sp. reportaron un contenido de fenoles totales entre 24.3-101 mg EAG/g extracto.

Los flavonoides son el grupo de compuestos fenólicos que se asumía su acumulación sólo en las plantas, pero no en hongos (Ferreira, Barros y Abreu, 2009); sin embargo, los estudios actuales registran una buena cantidad de flavonoides en diferentes especies del reino fungi (Barros *et al.*, 2008; Loganathan *et al.*, 2009). El contenido de flavonoides totales en las cuatro especies de *Ganoderma* osciló entre 0.56 ± 0.01 y 0.93 ± 0.01 mg EQ/g extracto. El extracto etanólico de *G. lucidum* presento el mayor contenido de flavonoides totales, mientras que los extractos de *G. weberianum* y *G. oerstedii* no mostraron diferencia significativa (**Figura 18b**). Estos resultados se encuentran dentro del rango 0.29-0.84 mg EQ/g extracto reportado en la literatura para especies de

*Ganoderma* como *G. lucidum*, *G. tsugae*, *G. applanatum* y *G. carnosum* estudiadas por (Cilerdzic, Stajic y Vukojevic, 2015; Rajoriya, Tripathy y Gupta, 2015).



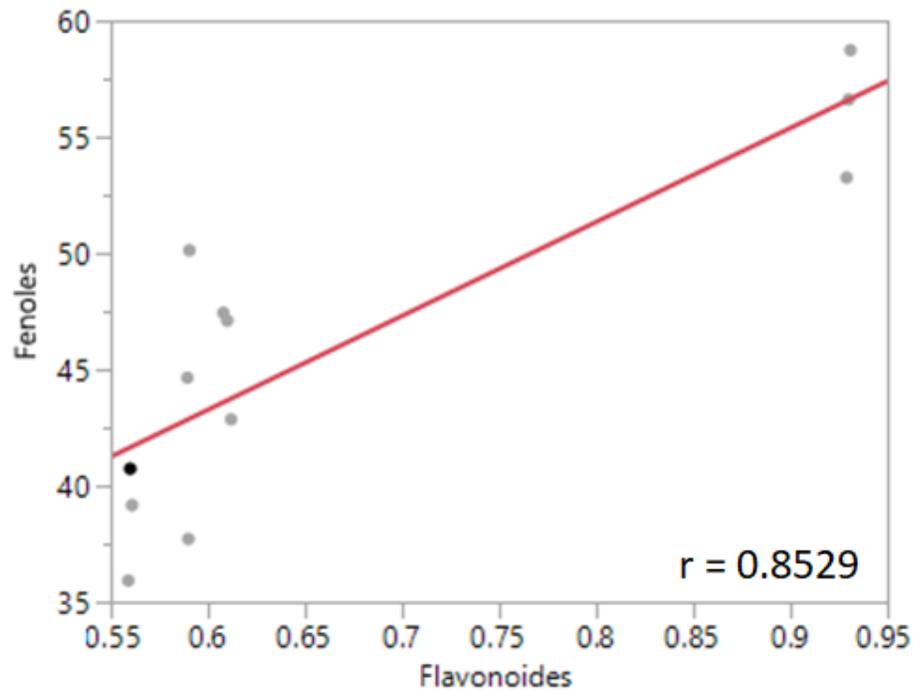
**Figura 18.** Diagrama de barra de los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos etanólicos de *Ganoderma*: a) Fenoles totales, b) Flavonoides totales.

Se halló una correlación significativa (mayor a 0.5) entre la actividad antioxidante obtenidos por DPPH, ABTS y FRAP con el contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de *Ganoderma* como se muestra en la **Tabla 12** y **Anexo D**. La correlación obtenida entre fenoles totales y actividad antioxidante por los método DPPH y ABTS es superior a la de flavonoides, observación también reportada por (Ćilerdžić *et al.*, 2014).

**Tabla 12.** Correlación entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante

	coeficiente de correlación (r)		
	DPPH	ABTS	FRAP
Fenoles Totales	0.6489*	0.6436*	0.8779*
Flavonoides Totales	0.5712	0.5821*	0.9679*

**r\*- valores son estadísticamente significativos (p<0.05)**



**Figura 19.** Correlación entre fenoles y flavonoides totales.

Numerosos reportes han mostrado una cercana relación entre los compuestos fenólicos de especies de *Ganoderma* y la actividad antioxidante (Cilerdzic, Stajic y Vukojevic, 2015; Rašeta *et al.*, 2020). Al comparar los coeficientes de correlación es posible sugerir que los grupos fenólicos y flavonoides son responsables de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *Ganoderma*; sin embargo, no se puede considerar que la actividad antioxidante se deba solo a su presencia, puesto que en la composición química de los extractos existen otros metabolitos secundarios que debido a su estructura contribuyan a su eficacia antioxidante (Amzad y Dawood, 2015). Por otro lado, el coeficiente de correlación entre el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonoides totales es significativo  $r = 0.8529$  (**Figura 19**), lo cual indica que los flavonoides son uno de los principales compuestos fenólicos de los extractos de *Ganoderma*.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- a) El rendimiento de los extractos etanólicos de *Ganoderma*: *G. subincrustatum*, *G. weberianum*, *G. oerstedii* y *G. lucidum* tuvo un promedio de 5.33 %. Se propone la relación masa (1 g) / solvente (40 mL) y tiempo de 15 días para aumentar el rendimiento de extracción de compuestos bioactivos.
- b) Los extractos etanólicos de *Ganoderma* mostraron actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares evaluadas, los cambios morfológicos indican la inducción de apoptosis y muerte celular autofágica.
- c) Los extractos etanólicos de *Ganoderma* mostraron capacidad para suprimir la producción de ON. Se sugiere que las moléculas bioactivas como esteroides, polisacáridos y triterpenos presentes en *Ganoderma* pueden ejercer un efecto antiinflamatorio sinérgico a través de diferentes mecanismos.
- d) Los extractos etanólicos de las especies estudiadas de *Ganoderma* mostraron moderada actividad antioxidante. Se observó la existencia de una correlación significativa entre fenoles y flavonoides totales y la actividad antioxidante.
- e) Los extractos etanólicos de *Ganoderma* no mostraron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, mientras que frente a *Staphylococcus aureus* fue débil.

## 5.2.Recomendaciones

Optimizar el proceso de maceración descrito en la metodología, planteando un diseño central compuesto agregando otras variables de interés y al menos un par de puntos centrales, que permiten estimar la curvatura y encontrar las condiciones que optimizan la variable respuesta (rendimiento de extracción).

Evaluar estos extractos sobre otras líneas celulares, principalmente sobre líneas no cancerosas humanas para conocer la selectividad real de los extractos.

Los mecanismos de los extractos de especies de *Ganoderma* para inhibir la producción de ON permanecen inciertos. Es necesario la realización de estudios donde se determine la cuantificación de las proteínas diana posibles.

Realizar fraccionamiento de los extractos y evaluar nuevamente las actividades biológicas, caracterizar químicamente las moléculas con actividad y estudiar sus posibles mecanismos.

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, E. *et al.* (2014) «Biodiversidad de hongos en México», *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), pp. 76-81. doi: 10.7550/rmb.33649.

Alam, M. N., Bristi, N. J. y Rafiquzzaman, M. (2013) «Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity», *Saudi Pharmaceutical Journal*. Elsevier, pp. 143-152. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.

Amen, Y. M. *et al.* (2016) «Lucidumol C, a new cytotoxic lanostanoid triterpene from *Ganoderma lingzhi* against human cancer cells», *Journal of Natural Medicines*, 70(3), pp. 661-666. doi: 10.1007/s11418-016-0976-2.

Amzad, M. y Dawood, M. (2015) «A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*», *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), pp. 66-71. doi: 10.1016/J.ARABJC.2011.01.007.

Avello, M. y Suwalsky, M. (2006) «Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección», *Atenea*, II Seminar(494), pp. 161-172. doi: 10.4067/s0718-04622006000200010.

Ayala, N. *et al.* (2016) «Los Hongos como fuente de recursos farmacológicos: *Ganoderma lucidum*; *Grifola frondosa*; y *Pleurotus ostreatus*», *Temas de Ciencia y Tecnología*, 20(58), pp. 25-36.

Baby, S., Johnson, A. J. y Govindan, B. (2015) «Secondary metabolites from *Ganoderma*», *Phytochemistry*, 114, pp. 66-101. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.03.010.

- Barros, L. *et al.* (2008) «Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals», *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), pp. 2742-2747. doi: 10.1016/j.fct.2008.04.030.
- Batra, P., Sharma, A. y Khajuria, R. (2013) «Probing Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): A Bitter Mushroom with Amazing Health Benefits», *International journal of medicinal mushrooms*, 15, pp. 127-143. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i2.20.
- Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. (1996) «The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay», *Analytical Biochemistry*, 239(1), pp. 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Bishop, K. S. *et al.* (2015) «From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals», *Phytochemistry*, 114, pp. 56-65. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.015.
- Blackwell, M. (2011) «The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?», *American Journal of Botany*, 98(3), pp. 426-438. doi: 10.3732/ajb.1000298.
- Bogdan, C. (2001) «Nitric oxide and the immune response», *Nature Immunology*, 2(10), pp. 907-916. doi: 10.1038/ni1001-907.
- Charvel, S. *et al.* (2019) «Needs in coverage and care for lung cancer in Mexico», *Salud Publica de Mexico*, 61(3), pp. 339-346. doi: 10.21149/10114.
- Cheng, C. R. *et al.* (2010) «Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*», *Phytochemistry*, 71(13), pp. 1579-1585. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.06.005.
- Ćilerdžić, J. *et al.* (2014) «Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate», *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), pp. 312-319. doi: 10.1016/j.jep.2014.05.036.
- Cilerdzic, J., Stajic, M. y Vukojevic, J. (2015) «Potential of Submergedly Cultivated Mycelia of *Ganoderma* spp. as Antioxidant and Antimicrobial Agents», *Current*

*Pharmaceutical Biotechnology*, 17(3), pp. 275-282. doi: 10.2174/1389201016666150930115944.

Coleman, J. W. (2001) «Nitric oxide in immunity and inflammation», *International Immunopharmacology*. Elsevier, pp. 1397-1406. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00086-8.

Constanza, L. y Muñoz, M. M. (2012) «Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno», *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), pp. 135-250.

Cör, D., Knez, Ž. y Knez, M. (2018) «Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of Ganoderma Lucidum Terpenoids and Polysaccharides: A Review», *Molecules*, 23, p. 649. doi: 10.3390/molecules23030649.

Costa, D. H. *et al.* (2017) «Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of Amauroderma s. lat. Raised new perspectives in the generic classification of the Ganodermataceae family», *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39(December), pp. 254-269. doi: 10.3767/persoonia.2017.39.10.

Escobar, L., Rivera, A. y Aristizábal, F. (2010) «Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas.», *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17(1), pp. 67-74.

Esqueda, M. *et al.* (2010) «Hongos», en Molina, F. y Van Devender, T. (eds.) *Diversidad Biológica de Sonora*. Primera. México, Distrito Federal, pp. 189-205.

Estrada, G. I. y Ramirez, M. C. (2019) *Micología general, Microbiología y parasitología médicas*. Editado por C. Castaño. Disponible en: [https://cercabib.ub.edu/iii/encore/record/C\\_\\_Rb2056774\\_\\_Sprats\\_microbiologia\\_\\_Orightresult\\_\\_U\\_\\_X2?lang=cat%0Ahttp://absysweb.cpd.uniovi.es/cgi-bin/abnetopac?TITN=1028284](https://cercabib.ub.edu/iii/encore/record/C__Rb2056774__Sprats_microbiologia__Orightresult__U__X2?lang=cat%0Ahttp://absysweb.cpd.uniovi.es/cgi-bin/abnetopac?TITN=1028284).

Ferreira, I., Barros, L. y Abreu, R. (2009) «Antioxidants in Wild Mushrooms», *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), pp. 1543-1560. doi: 10.2174/092986709787909587.

Ferreira, I. C. F. R. *et al.* (2015) «Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities», *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, pp. 38-55. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.10.011.

Figlas, D. y Curvetto, N. (2012) *Monografía sobre las propiedades medicinales del hongo Reishi (Ganoderma lucidum)*.

Figueroa, N. *et al.* (2008) «Expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias», *Endocrinología y Nutrición*, 55(8), pp. 340-345. doi: 10.1016/S1575-0922(08)72794-3.

Galvez, L. *et al.* (2021) «Actividad antioxidante del gel a base de extracto de Origanum vulgare ¿Importante para la salud bucal? Estudio preliminar», *Revista Estomatológica Herediana*, 31(1), pp. 6-16. doi: 10.20453/reh.v31i1.3921.

Gao, Y. *et al.* (2011) «Study of the extraction process and in vivo inhibitory effect of ganoderma triterpenes in oral mucosa cancer», *Molecules*, 16(7), pp. 5315-5332. doi: 10.3390/molecules16075315.

García, P. (2008) «Inflamación», *Cienc.Exact.Fís.Nat.*, 102(1), pp. 91-159.

Gerber, A. *et al.* (2000) «Triterpenes and Sterols from Ganoderma australe (Fr.) Pat. (Aphyllophoromycetidae)», *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2, p. 9. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v2.i4.100.

González, A. *et al.* (2011) «Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónica y el desarrollo de diabetes y obesidad», *Cir Cir*, 79(2), pp. 209-216.

González, M. y Padrón, A. (2019) «La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI.», *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), pp. 30-44. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2445> (Accedido: 19 de octubre de 2020).

Guzik, T. J., Korbut, R. y Adamek, T. (2003) «Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation

and Immune Regulation.», *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(4), pp. 469-487. Disponible en: [www.jpp.krakow.pl](http://www.jpp.krakow.pl) (Accedido: 30 de junio de 2021).

Guzman, B. y Morales, E. (2016) *Actividad antibacteriana de extractos fúngicos de Ganoderma applanatum sobre cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa aisladas del hardware de computadoras*. Universidad nacional de la Amazonía Peruana.

Guzmán, M. N. *et al.* (2013) *Estudio químico y actividades antioxidante y bactericida de Ganoderma applanatum, Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Enero-Junio.

Hapuarachchi, K. *et al.* (2019) «High diversity of Ganoderma and Amauroderma (Ganodermataceae, Polyporales) in Hainan Island, China», *Mycosphere*, 10(1), pp. 221-309. doi: 10.5943/mycosphere/10/1/6.

Hapuarachchi, K. K. *et al.* (2018) «High diversity of Ganoderma and Amauroderma (Ganodermataceae, Polyporales) in Hainan Island, China», *Mycosphere*, 9(5), pp. 931-982. doi: 10.5943/mycosphere/9/5/1.

Hasnat, M. A. *et al.* (2015) «Anti-inflammatory activity on mice of extract of Ganoderma lucidum grown on rice via modulation of MAPK and NF-κB pathways», *Phytochemistry*, 114, pp. 125-136. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.10.019.

Heleno, S. A. *et al.* (2012) «Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of Ganoderma lucidum from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts», *Food Research International*, 46(1), pp. 135-140. doi: 10.1016/j.foodres.2011.12.009.

Hernanz, M. D. y Herrador, M. A. (2016) *Importancia de la calibración en los laboratorios de Química Analítica*.

INEGI (2018) *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*.

Islas, M. Á. *et al.* (2017) «Preliminary study of antioxidant activity of three species of

Ganoderma genus (Polyporaceae) native of Hidalgo State, México», *Scientia Fungorum*, 46, pp. 37-45.

Ivone, H. (2015) *Optimización de la extracción de los principales compuestos bioactivos de Ganoderma curtisii*. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

Jiménez, C. (2013) «El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual», *An. Quím.*, 109(2), pp. 134-141.

Joseph, S. *et al.* (2009) «Antioxidative and antiinflammatory activities of the chloroform extract of Ganoderma Lucidum found in South India», *Scientia Pharmaceutica*, 77(1), pp. 111-121. doi: 10.3797/scipharm.0808-17.

Kan, Y. *et al.* (2015) «Antioxidant activity of polysaccharide extracted from Ganoderma lucidum using response surface methodology», *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, pp. 151-157. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.056.

Kicel, A. y Wolbiś, M. (2013) «Phenolic content and dpph radical scavenging activity of the flowers and leaves of Trifolium repens», *Natural Product Communications*, 8(1), pp. 99-102. doi: 10.1177/1934578x1300800122.

Klionsky, D. J. *et al.* (2003) «A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes», *Developmental Cell*, 5(4), pp. 539-545. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00296-X.

Ko, H. H. *et al.* (2008) «Antiinflammatory triterpenoids and steroids from Ganoderma lucidum and G. tsugae», *Phytochemistry*, 69(1), pp. 234-239. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.008.

Kosanić, M. y Ranković, B. (2011) «Antioxidant and antimicrobial properties of some lichens and their constituents», *Journal of Medicinal Food*, 14(12), pp. 1624-1630. doi: 10.1089/jmf.2010.0316.

Kozarski, M. *et al.* (2012) «Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes and Trametes versicolor», *Journal of Food*

*Composition and Analysis*, 26(1-2), pp. 144-153. doi: 10.1016/j.jfca.2012.02.004.

Li, W. J. *et al.* (2012) «Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*», *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), pp. 689-694. doi: 10.1016/j.fct.2011.12.011.

Liang, C. *et al.* (2019) «Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y», *European Journal of Medicinal Chemistry*, 174(April), pp. 130-141. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.04.039.

Lin, Z. *et al.* (2019) *Ganoderma and Health: Biology, Chemistry and Industry*. Editado por Z. Lin y B. Yang. Singapore: Springer Singapore (Advances in Experimental Medicine and Biology). doi: 10.1007/978-981-13-9867-4.

Lisset, M. *et al.* (2015) «Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares.», *Revista Finlay*, 5(1), pp. 47-62.

Liu, J. Q. *et al.* (2011) «New alkaloids from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*», *Natural Products and Bioprospecting*, 1(2), pp. 93-96. doi: 10.1007/s13659-011-0026-4.

Liu, J. Q. *et al.* (2018) «Two new farnesyl phenolic compounds with anti-inflammatory activities from *Ganoderma duripora*», *Food Chemistry*, 263, pp. 155-162. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.097.

Liu, Y. W. *et al.* (2009) «Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of *ganoderma* on tumor cell lines», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), pp. 3087-3093. doi: 10.1021/jf900011f.

Liu, Z. *et al.* (2015) «Development of liposomal *Ganoderma lucidum* polysaccharide: Formulation optimization and evaluation of its immunological activity», *Carbohydrate Polymers*, 117, pp. 510-517. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.093.

Loganathan, J. *et al.* (2009) «Antioxidant and phytochemical potential of wild edible mushroom *Termitomyces reticulatus*: Individual cap and stipe collected from south eastern part of India», (January 2015).

- López, D. *et al.* (2016) «Diversidad y distribución de Ganoderma (Polyporales: Ganodermataceae) en Sonora, México», *Botanical Sciences*, 94(2), pp. 431-439. doi: 10.17129/botsci.463.
- López, D. (2016) *Taxonomía y actividad antiproliferativa de aislados de Ganoderma de Sonora: micelio vs cuerpos fructíferos.*
- López, D. *et al.* (2019) «Morphological characteristics of wild and cultivated Ganoderma subincrustatum from Sonora, Mexico», *Scientia Fungorum*, 49, p. e1213. doi: 10.33885/sf.2019.49.1213.
- López, J. C. *et al.* (2018) «Seasonal Effect on the Biological Activities of Litsea glaucescens Kunth Extracts», *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. doi: 10.1155/2018/2738489.
- López, X., Arboleda, C. y Segura, F. (2015) «Producción de polisacáridos a partir de Ganoderma sp., aislado en la región andina», *Rev. Colomb. Biotecnol*, XVII(Diciembre), pp. 44-54. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.47060.
- Ma, H. T., Hsieh, J. F. y Chen, S. T. (2015) «Anti-diabetic effects of Ganoderma lucidum», *Phytochemistry*, 114, pp. 109-113. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.017.
- Maldonado, O. *et al.* (2010) «Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas.», *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 10(2), pp. 32-39.
- Martín, M. T. y Domingo, J. (2011) «Carcinogénesis», *Salud Pública de México*, 53(5), pp. 405-414.
- Mau, J.-L. *et al.* (2005) «Antioxidant properties of methanolic extracts from Ganoderma tsugae», *Food Chemistry*, 93(4), pp. 641-649. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.043>.
- Melkonyan, H. S. *et al.* (1997) *SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins (cloning secreted proteins frizzled homologue)*, *Cell Biology*. Disponible en: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).

Mentel, M. y Breinbauer, R. (2007) «Combinatorial solid-phase natural product chemistry», *Topics in Current Chemistry*, 278, pp. 209-241. doi: 10.1007/128\_2006\_107.

Mercado, G. *et al.* (2015) «Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)», *Journal of Functional Foods*, 18, pp. 171-181. doi: 10.1016/j.jff.2015.07.001.

Mora, M. A. (2010) *Determinación estructural de los metabolitos secundarios triterpenoidales en búsqueda de antimicrobianos de un hongo silvestre Aphylophoral colombiano*. Universidad Nacional de Colombia.

Morales, R. (2015) *MADERA DE VID COMO SUSTRATO POTENCIAL PARA EL CULTIVO SÓLIDO DE Ganoderma spp.* COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL.

Murillo, J. I. (2003) *Compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica aislados de recursos naturales de Baja California Sur, México*. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Nagy, G. *et al.* (2007) «Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity», *Immunology Letters*, 111(1), pp. 1-5. doi: 10.1016/j.imlet.2007.04.013.

Nguyen, V. T. *et al.* (2015) «Cytotoxic and anti-angiogenic effects of lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum*», *Phytochemistry Letters*, 12, pp. 69-74. doi: 10.1016/j.phytol.2015.02.012.

Obiol, D. J. (2016) «*Estudio de potenciales estrategias terapéuticas para carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello y glioblastomas*».

Obodai, M. *et al.* (2017) «Chemical characterization and antioxidant potential of wild ganoderma species from Ghana», *Molecules*, 22(2). doi: 10.3390/molecules22020196.

OMS (2018) *Cáncer, Organización Mundial de la Salud*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Accedido: 8 de octubre de 2020).

Paulino, N. *et al.* (2008) «Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis», *European Journal of Pharmacology*, 587(1-3), pp. 296-301. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.02.067.

Pérez, C. A. *et al.* (2016) *Composición lipídica y evaluación de las actividades antioxidante y leishmanicida del basidiomiceto Ganoderma sp.*, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Disponible en: <http://scielo.sld.cu> (Accedido: 30 de diciembre de 2019).

Probes, M. (2003) «Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (G-7921)», p. 3. Disponible en: [www.probes.com](http://www.probes.com) (Accedido: 17 de noviembre de 2020).

Qiu, J., Wang, X. y Song, C. (2016) «Neuroprotective and antioxidant lanostanoid triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*», *Fitoterapia*, 109, pp. 75-79. doi: 10.1016/j.fitote.2015.12.008.

Rajoriya, A., Tripathy, S. y Gupta, N. (2015) *In vitro antioxidant activity of selected Ganoderma species found in Odisha, India*. Disponible en: [www.tropicalplantresearch.com](http://www.tropicalplantresearch.com) (Accedido: 27 de febrero de 2021).

Ramírez, W., Guevara, C. y Rodríguez, J. (2020) «Ácidos ganodéricos en *Ganoderma sp.*, *Ganoderma lucidum* y en su sustrato agotado», *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(1), pp. 206-216. doi: 10.18684/bsaa(19)206-216.

Ramos, A. *et al.* (2003) «Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants», *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), pp. 241-246. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00156-9.

Rašeta, M. *et al.* (2020) «Antidiabetic effect of two different: *Ganoderma* species tested in alloxan diabetic rats», *RSC Advances*, 10(17), pp. 10382-10393. doi: 10.1039/c9ra10158f.

Raymundo, T. *et al.* (2013) «Xylophagous Agaricomycetes in the central plains of the Sonoran desert», *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(2), pp. 417-424. doi: 10.7550/rmb.30828.

- Rizo Ríos, P. *et al.* (2015) «Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012», *Evidencia médica e investigación en salud*, 8(1), pp. 5-15.
- Roseta, M. *et al.* (2017) «Comparison of Antioxidant Capacities of two *Ganoderma lucidum* Strains of different Geographical Origins», *Matica Srpska J. Nat. Sci. Novi Sad*, №, 133, pp. 209-219. doi: 10.2298/ZMSPN1733209R.
- Roskov, Y. *et al.* (2020) *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2020-09-01 Beta*. 2020.<sup>a</sup> ed, [www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col). *Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands*. 2020.<sup>a</sup> ed. Editado por P. M. Kirk. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree/id/ae1248251bb9fea43741431c04671ee4>.
- Sanodiya, B. S. *et al.* (2009) «*Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus», *Current pharmaceutical biotechnology*, 10, pp. 717-742. doi: 10.2174/138920109789978757.
- Sato, N. *et al.* (2009) «Anti-human Immunodeficiency Virus-1 Protease Activity of New Lanostane-Type Triterpenoids from *Ganoderma sinense*», *Chem. Pharm. Bull.*, 57(10), pp. 1076-1080.
- Seca, A. M. L. y Pinto, D. C. G. A. (2018) «Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application», *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms19010263.
- Shanley, T. P. *et al.* (2002) «Role of nitric oxide in acute lung inflammation: lessons learned from the inducible nitric oxide synthase knockout mouse», *Critical care medicine*, 30(9), pp. 1960-1968. doi: 10.1097/00003246-200209000-00003.
- Shao, C. S. *et al.* (2020) «Ganoderic acid D induces synergistic autophagic cell death except for apoptosis in ESCC cells», *Journal of Ethnopharmacology*, 262(October), p. 113213. doi: 10.1016/j.jep.2020.113213.
- Sierra, M. *et al.* (2018) *Productos Naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Primera. Editado por R. Barros y D. Gómez. Bogotá D.C., Colombia:

Fundación Universitaria Agraria.

Solórzano, Y. (2017) *Estudio químico y actividad biológica del hongo Ganoderma cf. applanatum Pers. Pat. en la región Sur del Ecuador*. Universidad técnica particular de Loja.

Suárez, J. *et al.* (2018) «Micoquímica en México: breve reseña histórica.», *ScientiaFung Rum*, 48, pp. 99-111.

Tang, W. *et al.* (2006) «Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells», *Life Sciences*, 80(3), pp. 205-211. doi: 10.1016/j.lfs.2006.09.001.

Theis, N. y Lerdau, M. T. (2016) «The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites», *International Journal of Plant Sciences*, 164(3), pp. 92-102. doi: 10.1086/374190.

Torres, H. *et al.* (2019) «Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of *Ibervillea sonorae*», *South African Journal of Botany*, 125, pp. 207-213. doi: 10.1016/j.sajb.2019.07.029.

Tovar del Rio, J. (2013) *Determinación de la Actividad Antioxidante por DPPH y ATTS de 30 Plantas recolectadas en la Ecoregion Cafetera*. Universidad Tecnológica de Pereira.

Tran, H. B. *et al.* (2014) «molecules Hypotensive Effects and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Reishi (*Ganoderma lingzhi*) Auto-Digested Extract», *Molecules*, 19, pp. 13473-13485. doi: 10.3390/molecules190913473.

Trigos, Á. y Suárez, J. (2011a) «Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research», *Revista Mexicana de Micología*, 34, pp. 63-83. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88321339010> (Accedido: 10 de septiembre de 2020).

Trigos, Á. y Suárez, J. (2011b) «Metabolitos biológicamente activos del género

Ganoderma: tres décadas de investigación mico-química», *Revista mexicana de micología*, 34, pp. 63-83.

Tseng, Y. H., Yang, J. H. y Mau, J. L. (2008) «Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*», *Food Chemistry*, 107(2), pp. 732-738. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.073.

Tung, N. T. *et al.* (2013) «Inhibitory effect on NO production of triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*», *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(5), pp. 1428-1432. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.12.066.

Turkoglu, A. *et al.* (2007) «Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill», *Food Chemistry*, 101(1), pp. 267-273. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.025.

Ulbricht, C. *et al.* (2010) «Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*): Systematic review by the natural standard research collaboration», *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 8, pp. 148-159. doi: 10.2310/7200.2009.0029.

Usia, T. *et al.* (2002) «Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities», *Journal of Natural Products*, 65(5), pp. 673-676. doi: 10.1021/np010486c.

Vega, G. B. (2008) «Inmunología para el médico general Inflamación», *Rev Fac Med UNAM*, 51(5), pp. 220-222. Disponible en: [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com) (Accedido: 12 de octubre de 2020).

Velazquez, C. *et al.* (2007) «Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis», *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), pp. 1747-1756. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x.

Voigt, R. (1982) *Tratado de tecnología farmacéutica*. Editado por S. A. Editorial Acribia.

Wang, C. *et al.* (2019) «Triterpenes and aromatic meroterpenoids with antioxidant activity and neuroprotective effects from *Ganoderma lucidum*», *Molecules*, 24(23). doi: 10.3390/molecules24234353.

Wang, G. *et al.* (2007) «Enhancement of IL-2 and IFN- $\gamma$  expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo», *International Immunopharmacology*, 7, pp. 864-870. doi: 10.1016/j.intimp.2007.02.006.

Wang, X.-C. *et al.* (2012) «The Species Identity of the Widely Cultivated Ganoderma, “G. lucidum” (Ling-zhi), in China», *PLoS ONE*, 7(7), p. 40857. doi: 10.1371/journal.pone.0040857.

Wu, Y. L. *et al.* (2019) «Triterpenoids from Ganoderma lucidum and Their Potential Anti-inflammatory Effects», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(18), pp. 5147-5158. doi: 10.1021/acs.jafc.9b01195.

Xia, J. *et al.* (2020) «Ganoderic acid DM induces autophagic apoptosis in non-small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR activity», *Chemico-Biological Interactions*, 316(August 2019), p. 108932. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108932.

Xia, Q. *et al.* (2013) «A Comprehensive Review of the Structure Elucidation and Biological Activity of Triterpenoids from Ganoderma spp», *Molecules*, 19, pp. 17478-17535. doi: 10.3390/molecules191117478.

Xu, J. *et al.* (2021) «Anti-inflammatory effects of Ganoderma lucidum sterols via attenuation of the p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages», *Food and Chemical Toxicology*, 150(October 2020), p. 112073. doi: 10.1016/j.fct.2021.112073.

Xu, J. W., Zhao, W. y Zhong, J. J. (2010) «Biotechnological production and application of ganoderic acids», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), pp. 457-466. doi: 10.1007/s00253-010-2576-5.

Zengin, G. *et al.* (2015) «Two Ganoderma species: Profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer’s disease and skin disorders», *Food and Function*, 6(8), pp. 2794-2802. doi: 10.1039/c5fo00665a.

Zhang, W. *et al.* (2014) «Antiviral effects of two Ganoderma lucidum triterpenoids against

enterovirus 71 infection», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(3), pp. 307-312. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.019.

Zhong, J. J. y Xiao, J. H. (2009) «Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction.», *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, pp. 79-150. doi: 10.1007/10\_2008\_26.

Zhou, Y. *et al.* (2006) «A comparison of in vitro anticancerous activity and mechanism of ethanolic extracts from different Ganoderma genus», *Frontiers of Biology in China*, 1(3), pp. 275-279. doi: 10.1007/s11515-006-0034-7.

Zhu, K. X. *et al.* (2011) «Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ», *Food Chemistry*, 126(3), pp. 1122-1126. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.144.

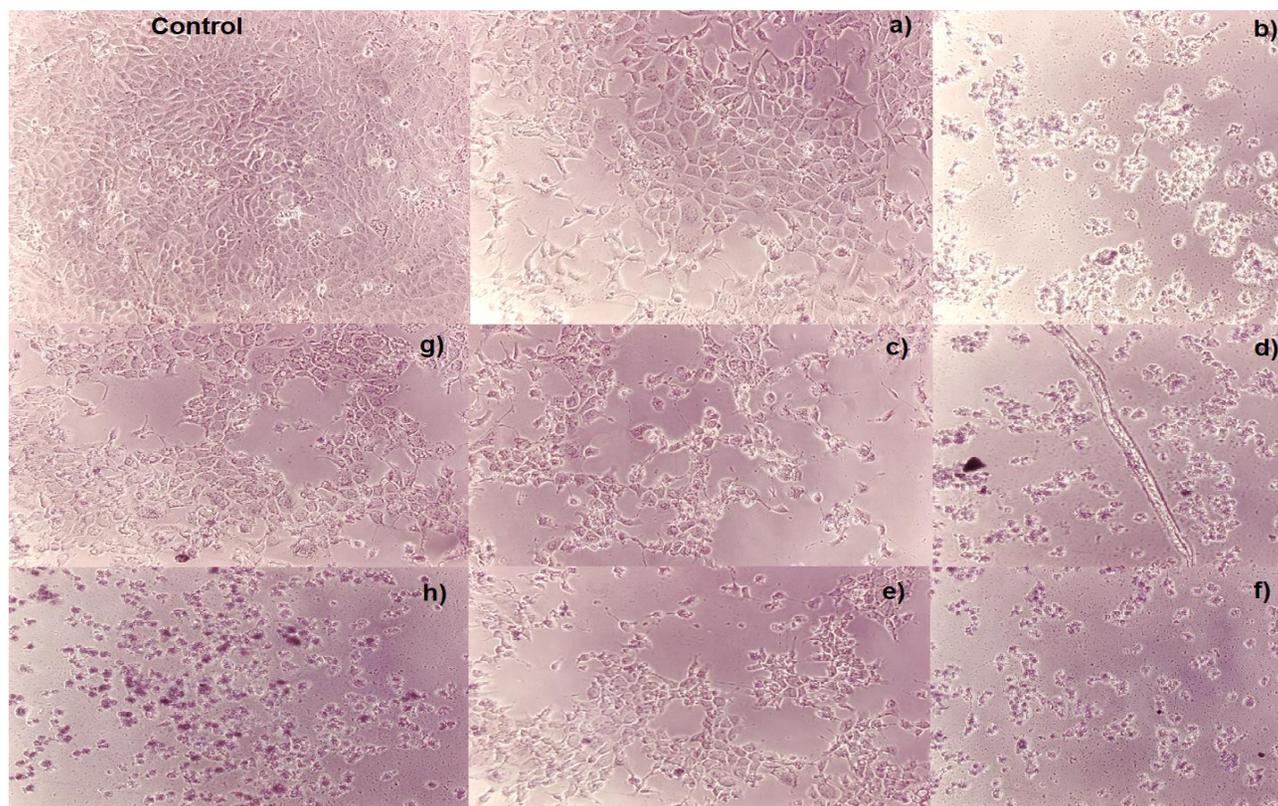
Zou, H. *et al.* (2020) «Application of Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling in Drug Delivery: Development and Challenges», *Frontiers in Pharmacology*, 11(July), pp. 1-15. doi: 10.3389/fphar.2020.00997.

Zuluaga, J. *et al.* (2007) «QUÍMICA Y ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE Y BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL HONGO *Ganoderma lucidum*», *Scientia et Technica*, XIII(33), pp. 329-332.

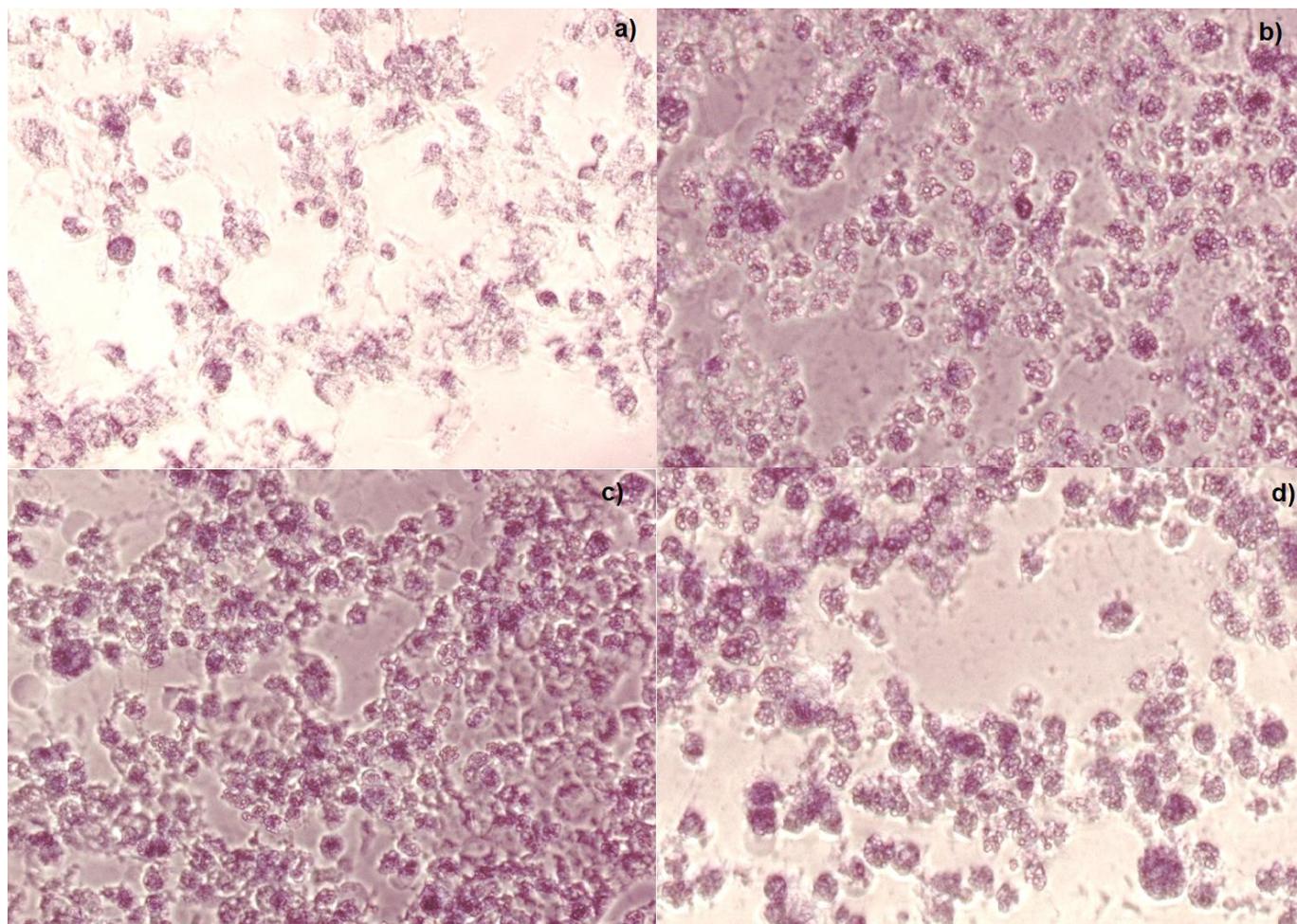
## ANEXOS

## Anexo A: Resultados de las mediciones del diseño 4x2 de extracción etanólica.

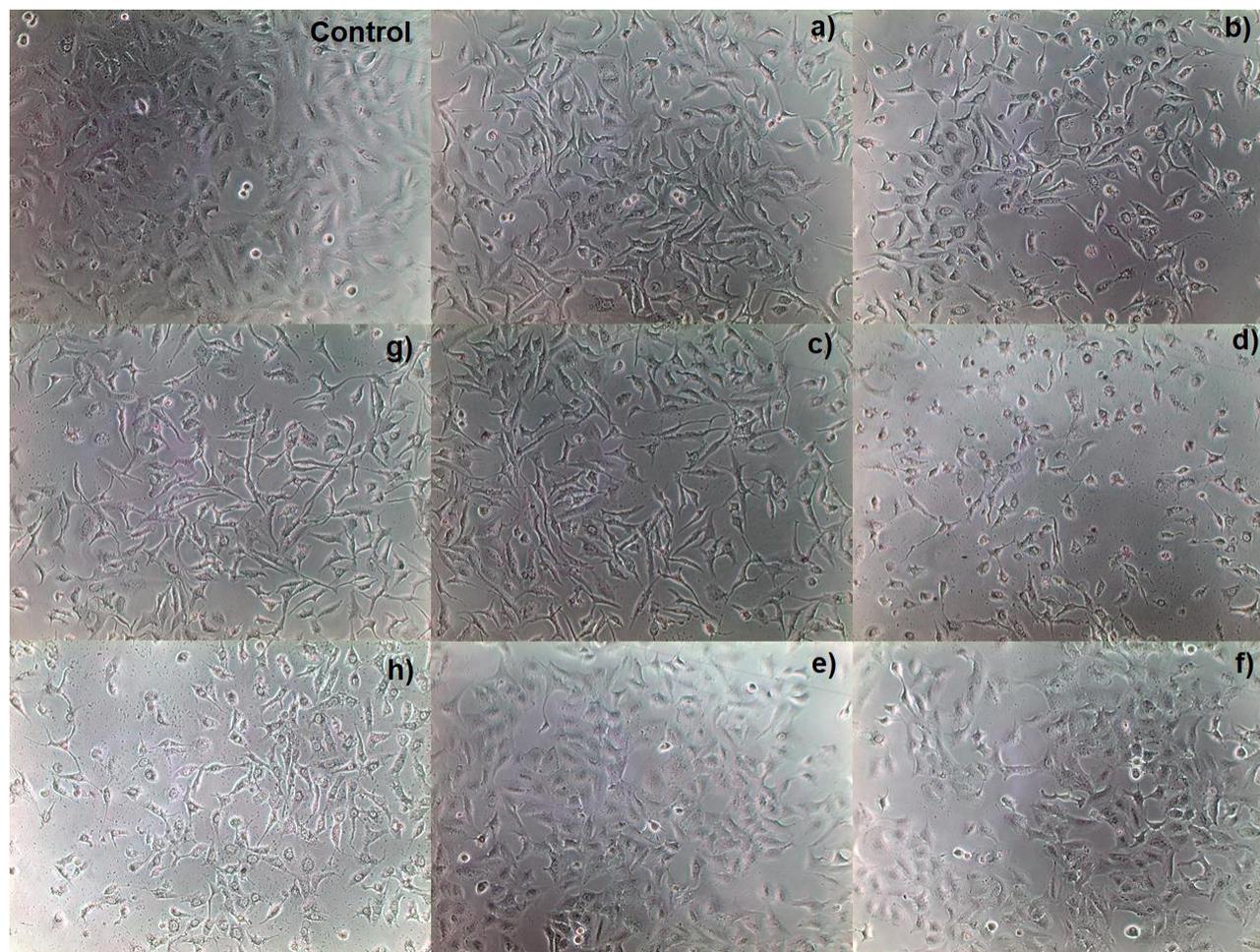
Tiempo (días)	Relación (g/mL)	muestra (g)		Tara (g)		Vial + Extracto (g)		Extracto seco (g)		% Extracción				
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	Promedio	SD	% CV
5	(1/30)	5.023	5.016	69.904	67.886	70.188	68.158	0.285	0.272	5.664	5.425	5.544	0.169	3.045
	(1/50)	5.033	5.042	66.830	68.548	67.141	68.867	0.311	0.319	6.185	6.329	6.257	0.101	1.621
7	(1/30)	5.092	5.286	68.728	68.540	69.017	68.829	0.290	0.290	5.688	5.479	5.583	0.148	2.642
	(1/50)	5.011	5.311	67.994	69.979	68.325	70.320	0.331	0.341	6.599	6.415	6.507	0.130	1.999
14	(1/30)	5.066	5.087	66.740	67.543	67.080	67.881	0.339	0.338	6.700	6.644	6.672	0.039	0.592
	(1/50)	5.134	5.097	68.410	68.275	68.799	68.665	0.389	0.389	7.580	7.635	7.608	0.039	0.511
21	(1/30)	5.029	5.102	67.666	67.562	68.007	67.903	0.341	0.341	6.781	6.677	6.729	0.074	1.092
	(1/50)	5.089	5.073	67.825	67.867	68.219	68.263	0.394	0.396	7.744	7.814	7.779	0.050	0.640

**Anexo B: Morfología línea celulares:**

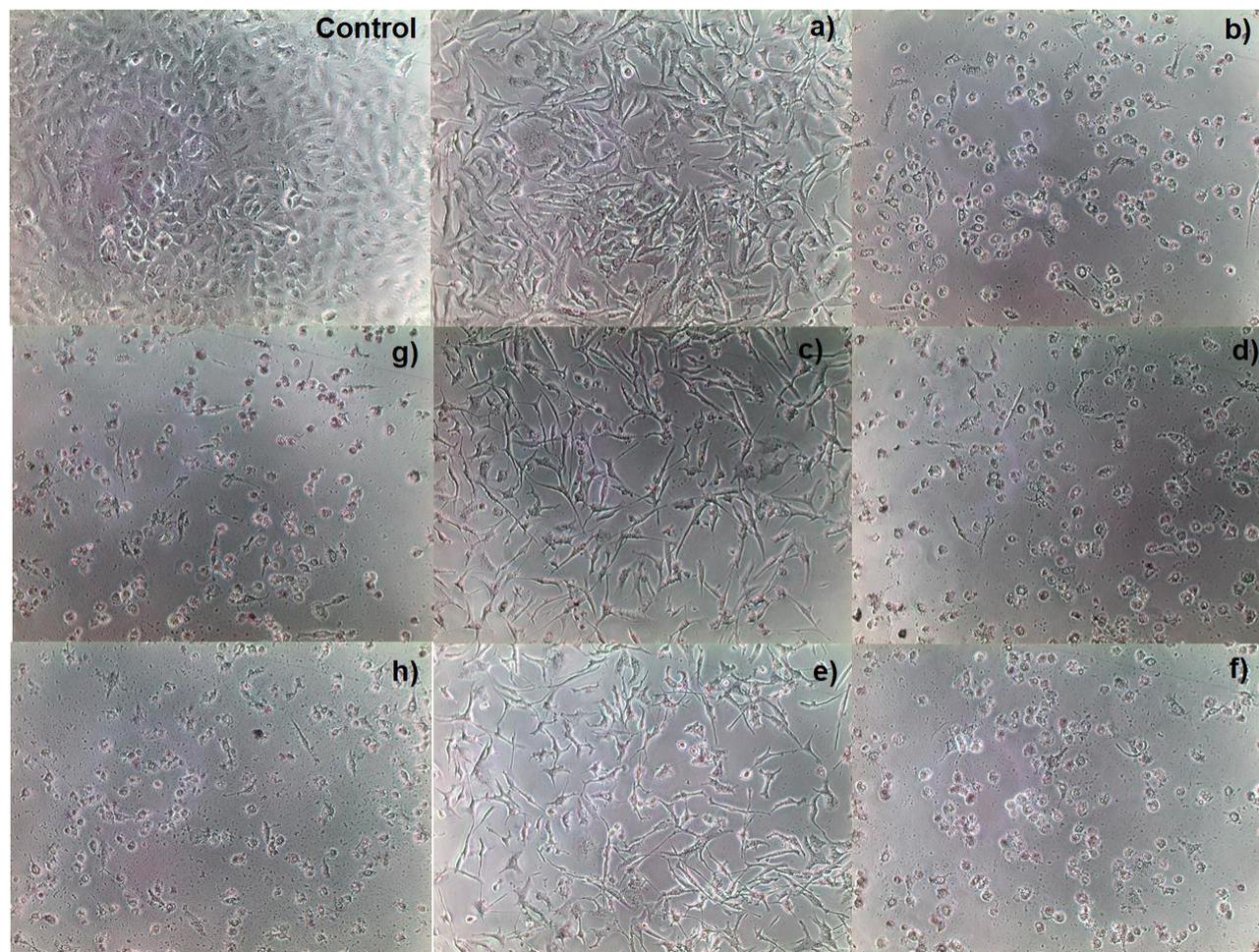
Línea celular MDA, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (100-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), aumento 10X: a)-b): *G. subincrustatum*; c)-d): *G. weberianum*; e)-f): *G. oerstedii* y g)-h): *G. lucidum*



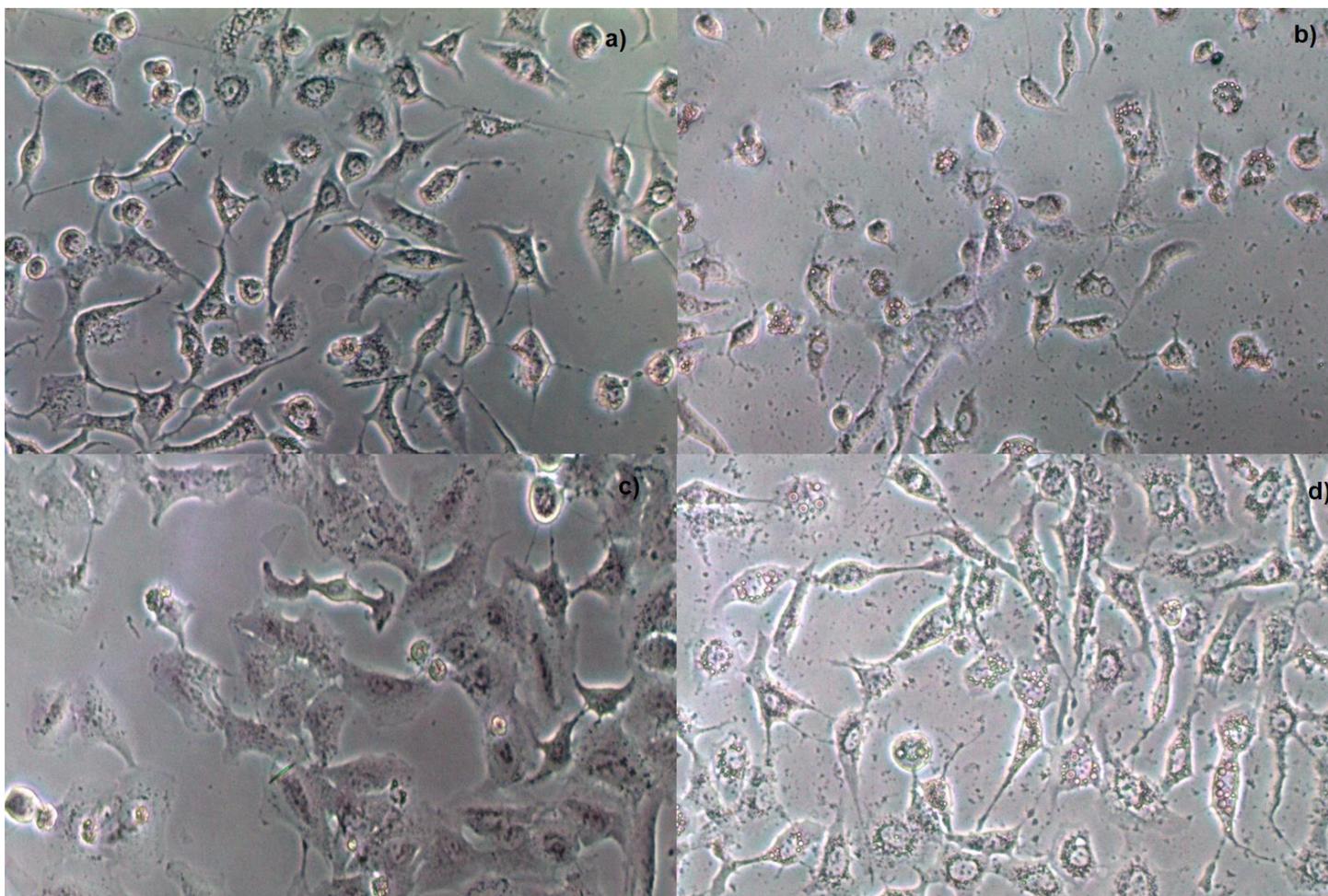
Línea celular MDA, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (200 µg/mL), aumento 20X: a) *G. subincrustatum*; b) *G. weberianum*; c) *G. oerstedii* y d) *G. lucidum*



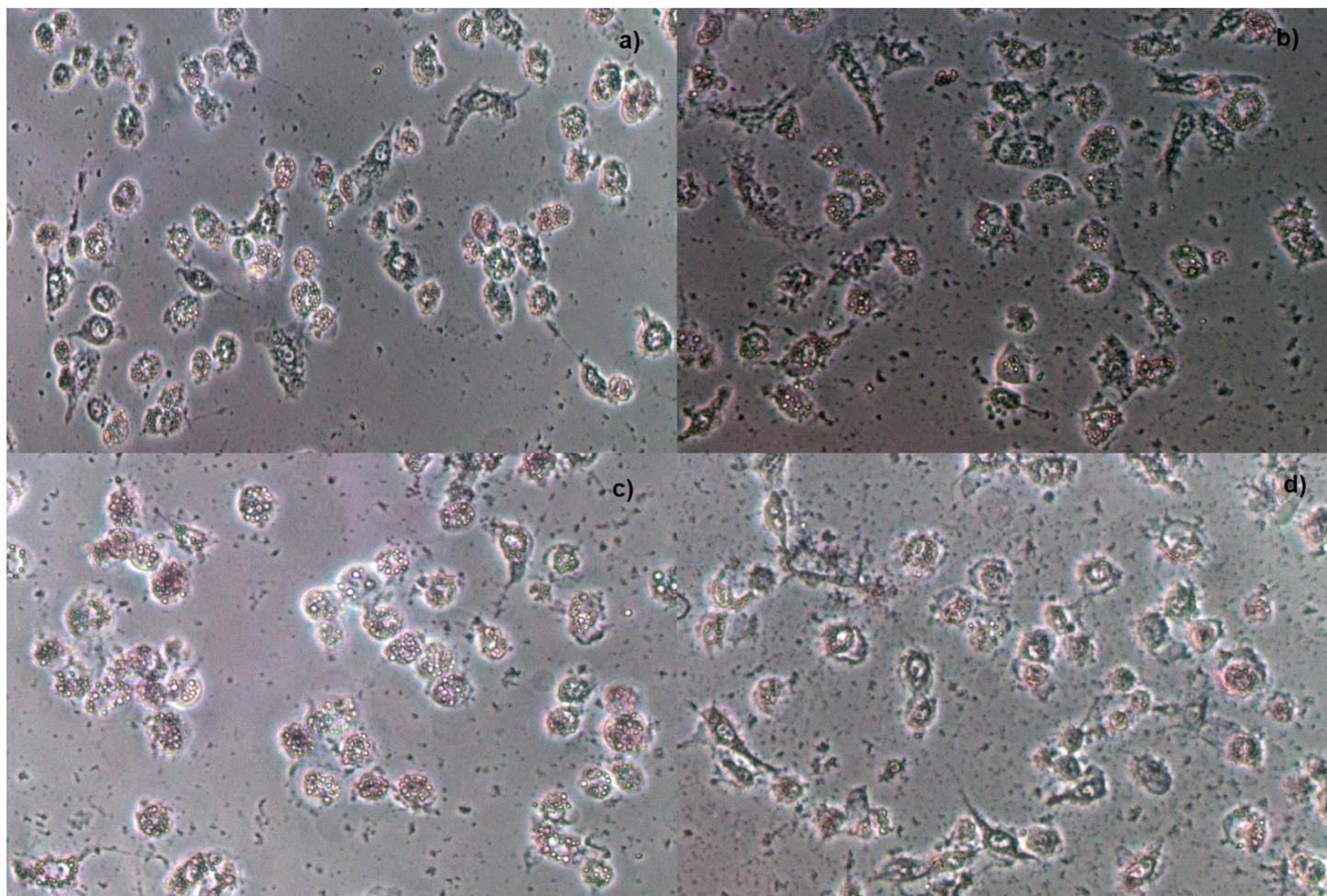
Línea celular A549, 24 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (100-200  $\mu\text{g/mL}$ ), aumento 10X: a)-b): *G. subincrustatum*; c)-d): *G. weberianum*; e)-f): *G. oerstedii* y g)-h): *G. lucidum*



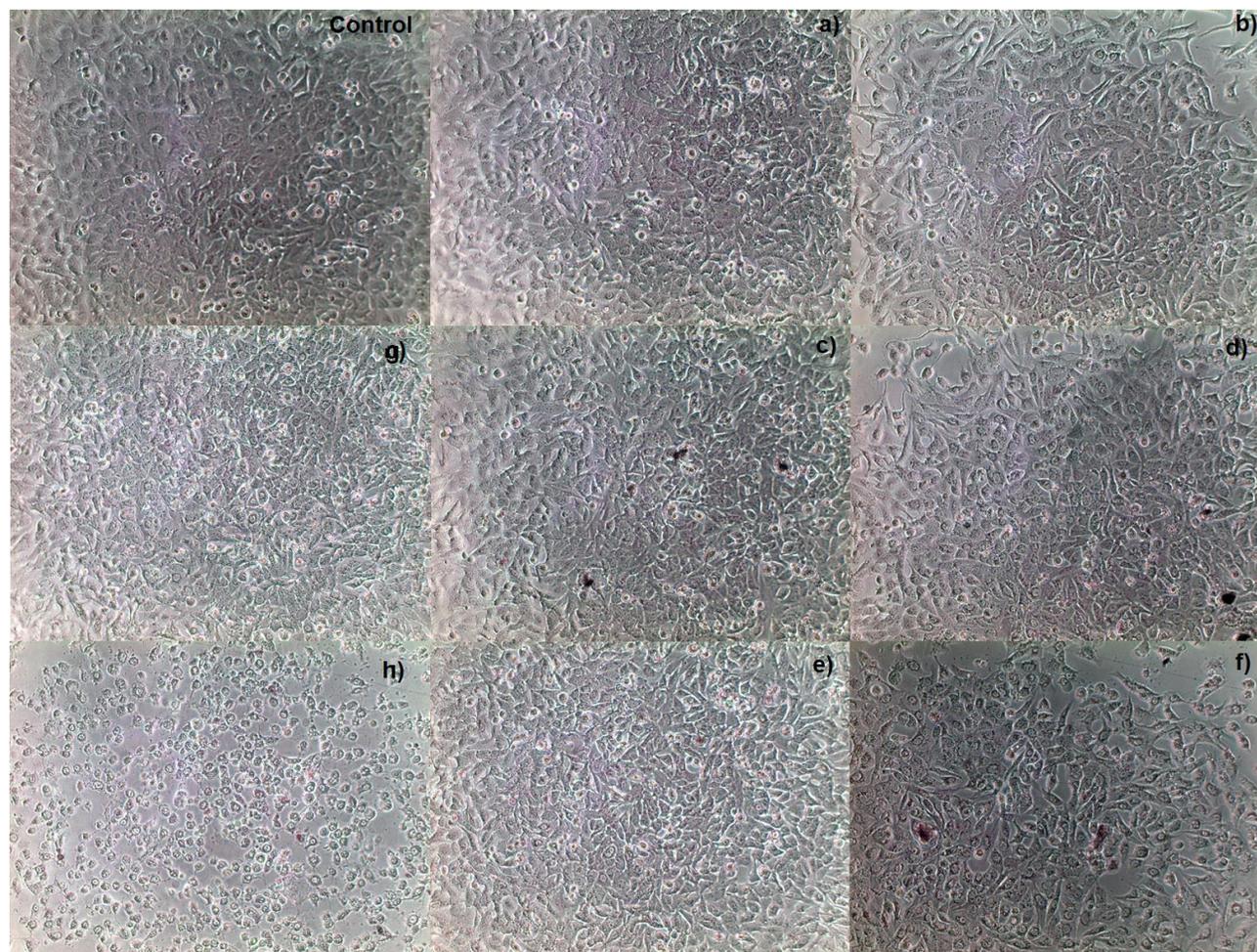
Línea celular A549, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (100-200  $\mu\text{g/mL}$ ), aumento 10X: a)-b): *G. subincrustatum*; c)-d): *G. weberianum*; e)-f): *G. oerstedii* y g)-h): *G. lucidum*



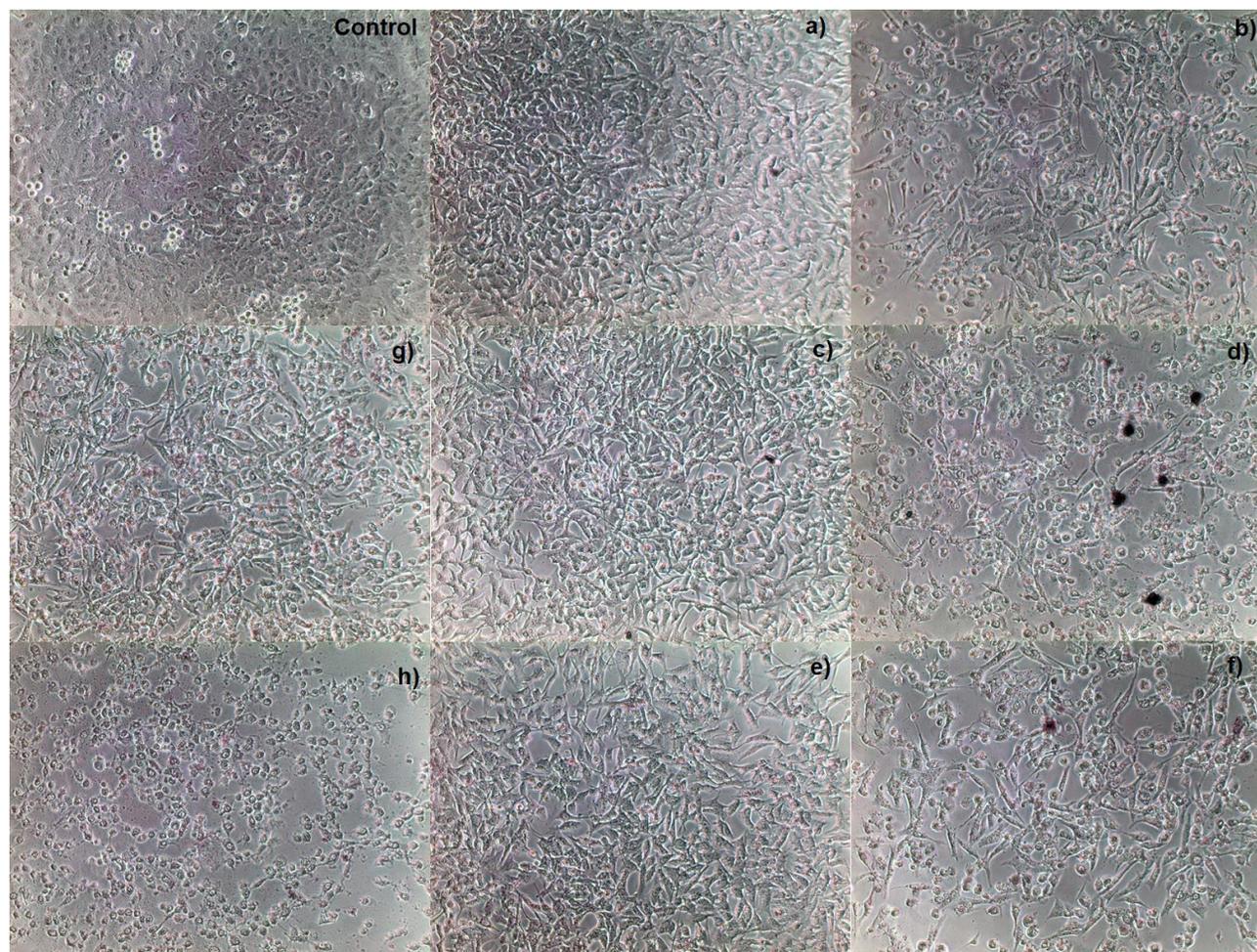
Línea celular A549, 24 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (200  $\mu\text{g/mL}$ ), aumento 20X: a) *G. subincrustatum*; b) *G. weberianum*; c) *G. oerstedii* y d) *G. lucidum*



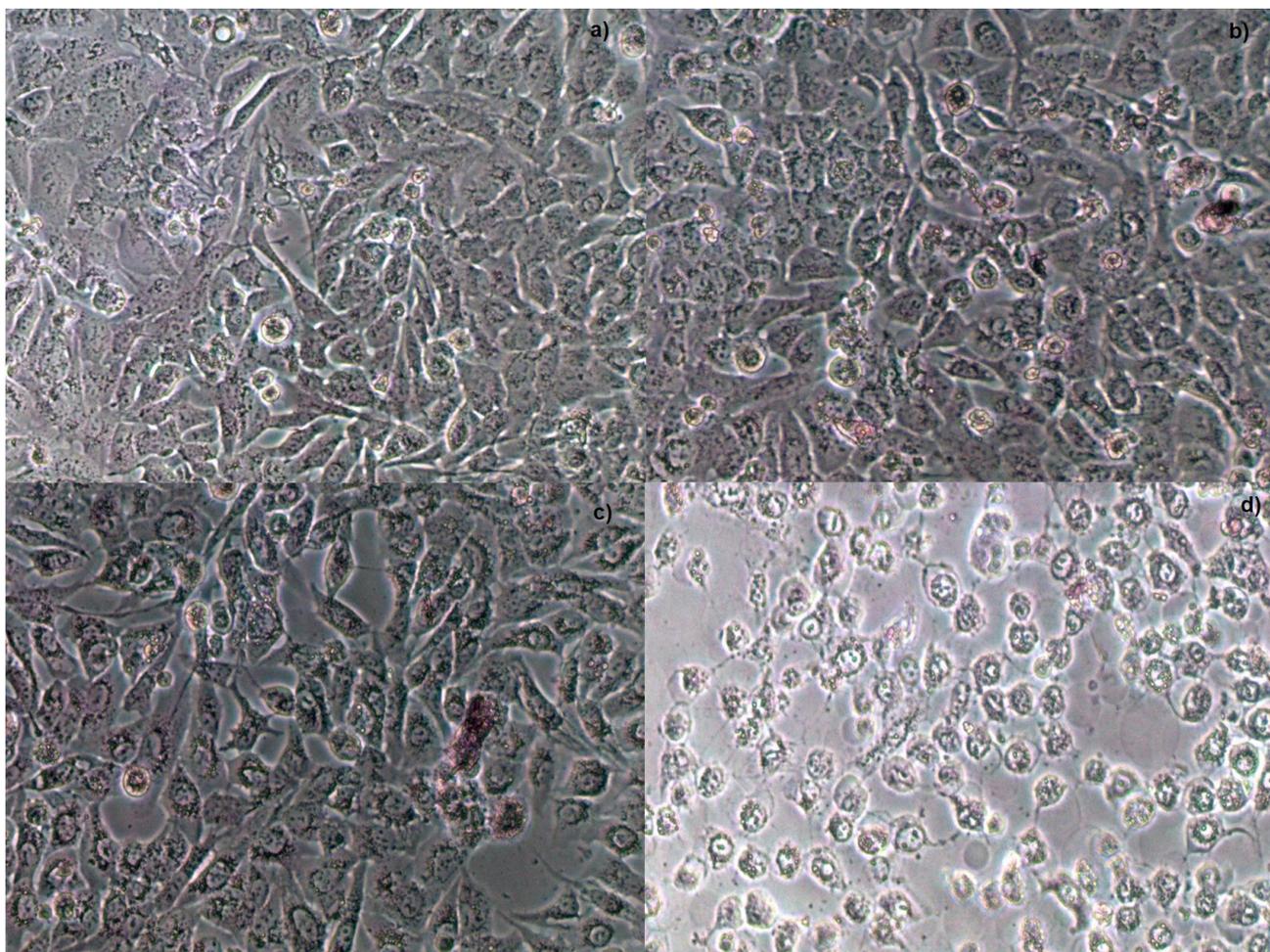
Línea celular A549, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (200 µg/mL), aumento 20X: a) *G. subincrustatum*; b) *G. weberianum*; c) *G. oerstedii* y d) *G. lucidum*



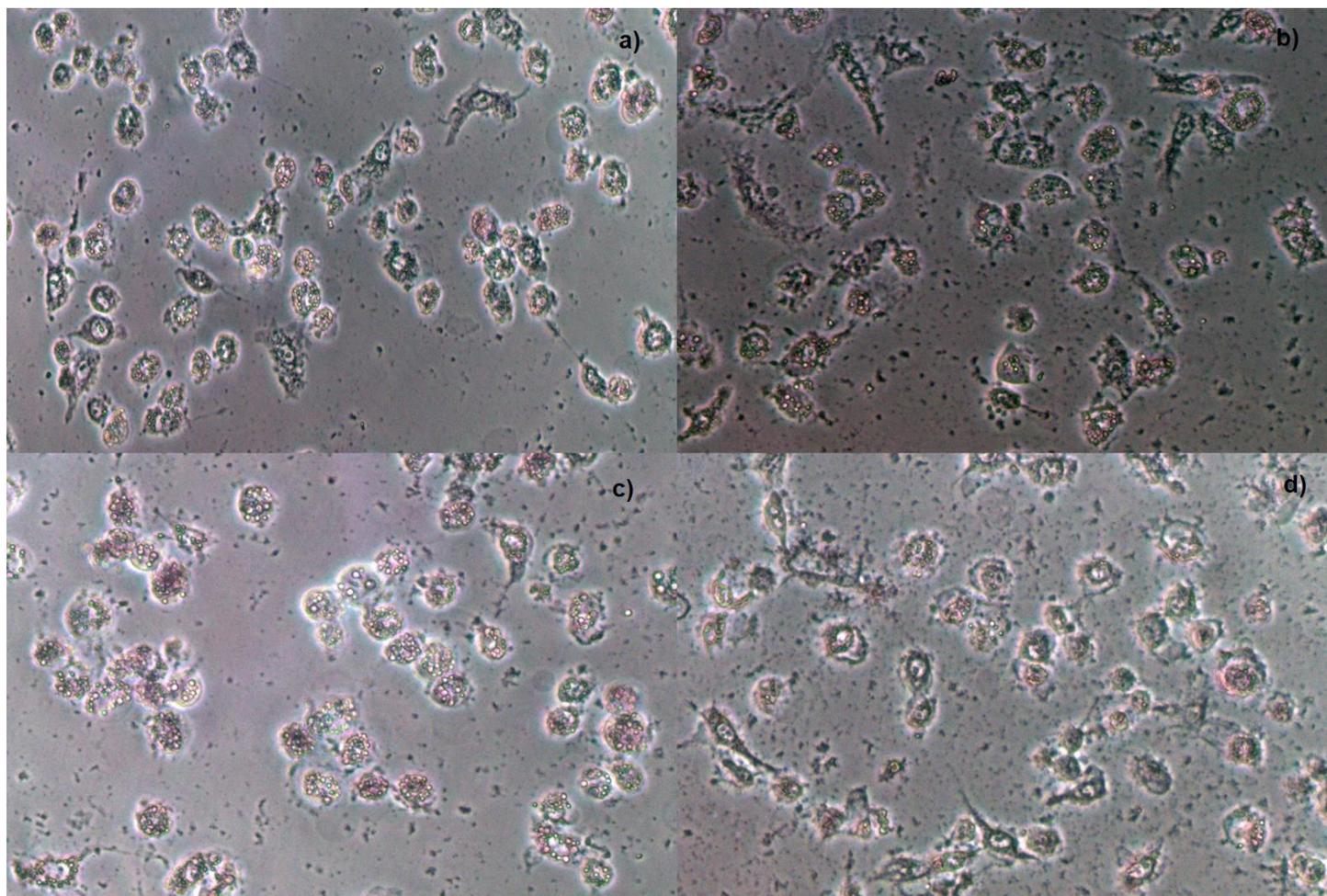
Línea celular Arpe-19, 24 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (100-200  $\mu\text{g/mL}$ ), aumento 10X: a)-b): *G. subincrustatum*; c)-d): *G. weberianum*; e)-f): *G. oerstedii* y g)-h): *G. lucidum*



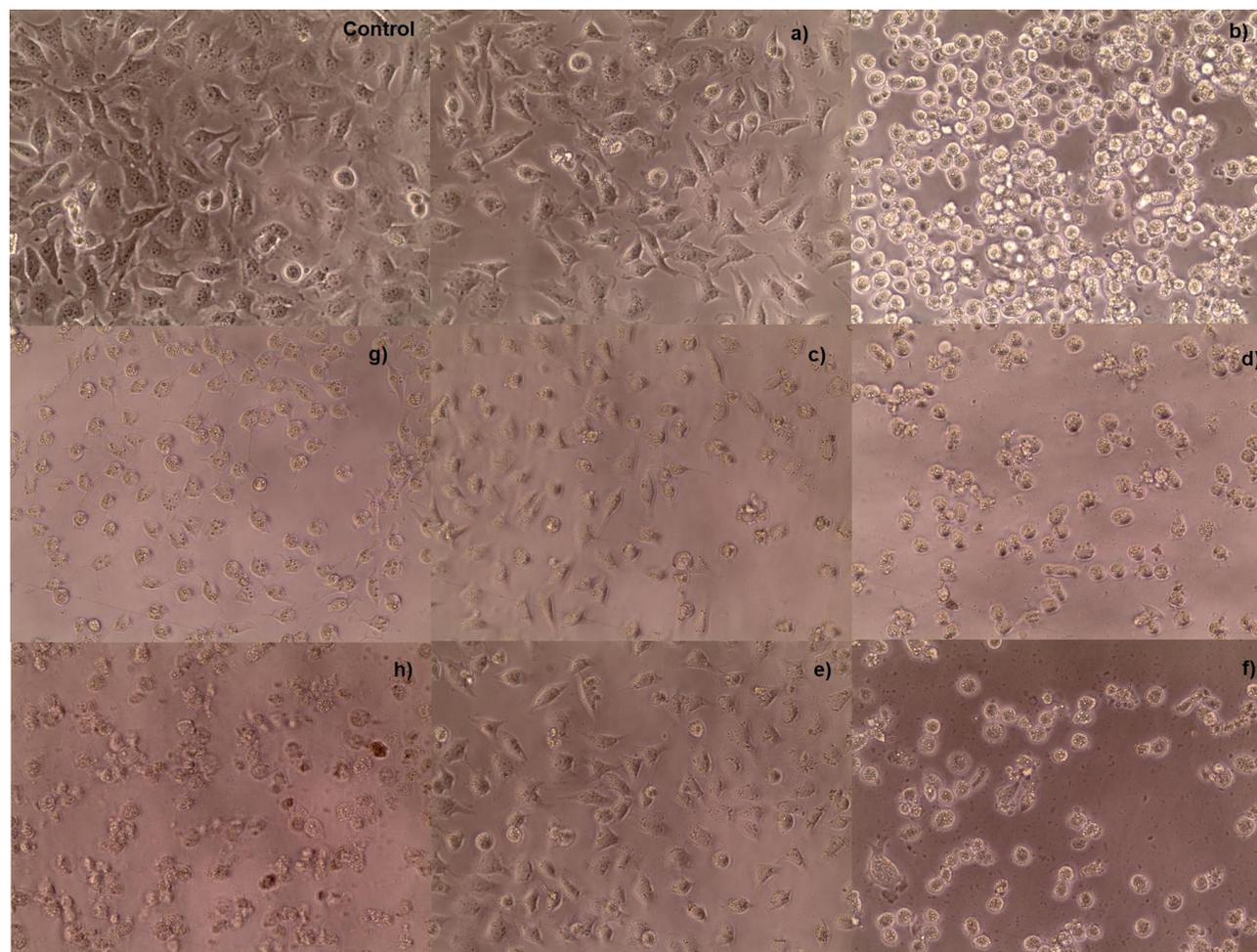
Línea celular Arpe-19, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (100-200  $\mu\text{g/mL}$ ), aumento 10X: a)-b): *G. subincrustatum*; c)-d): *G. weberianum*; e)-f): *G. oerstedii* y g)-h): *G. lucidum*



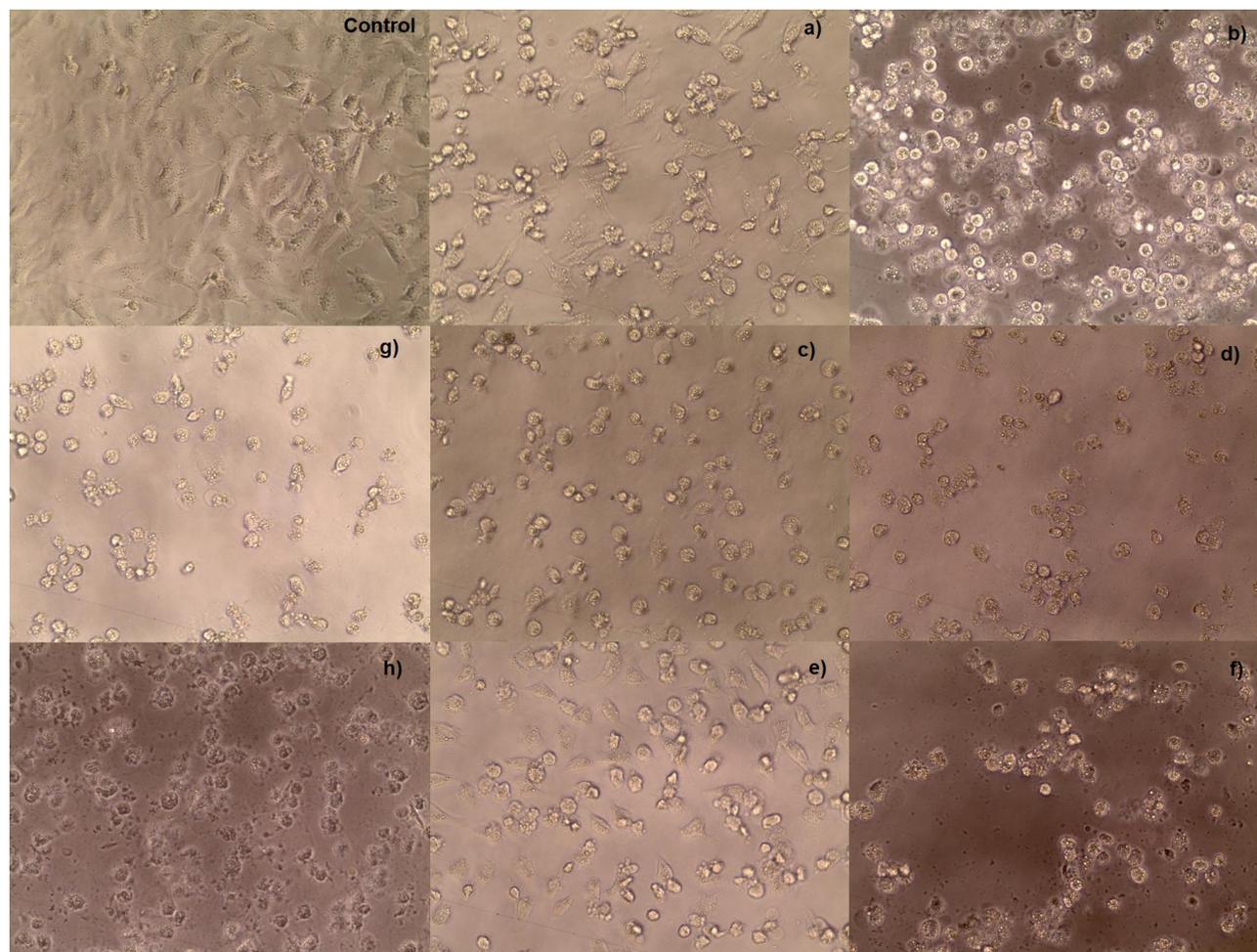
Línea celular Arpe-19, 24 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (200 µg/mL), aumento 20X: a) *G. subincrustatum*; b) *G. weberianum*; c) *G. oerstedii* y d) *G. lucidum*



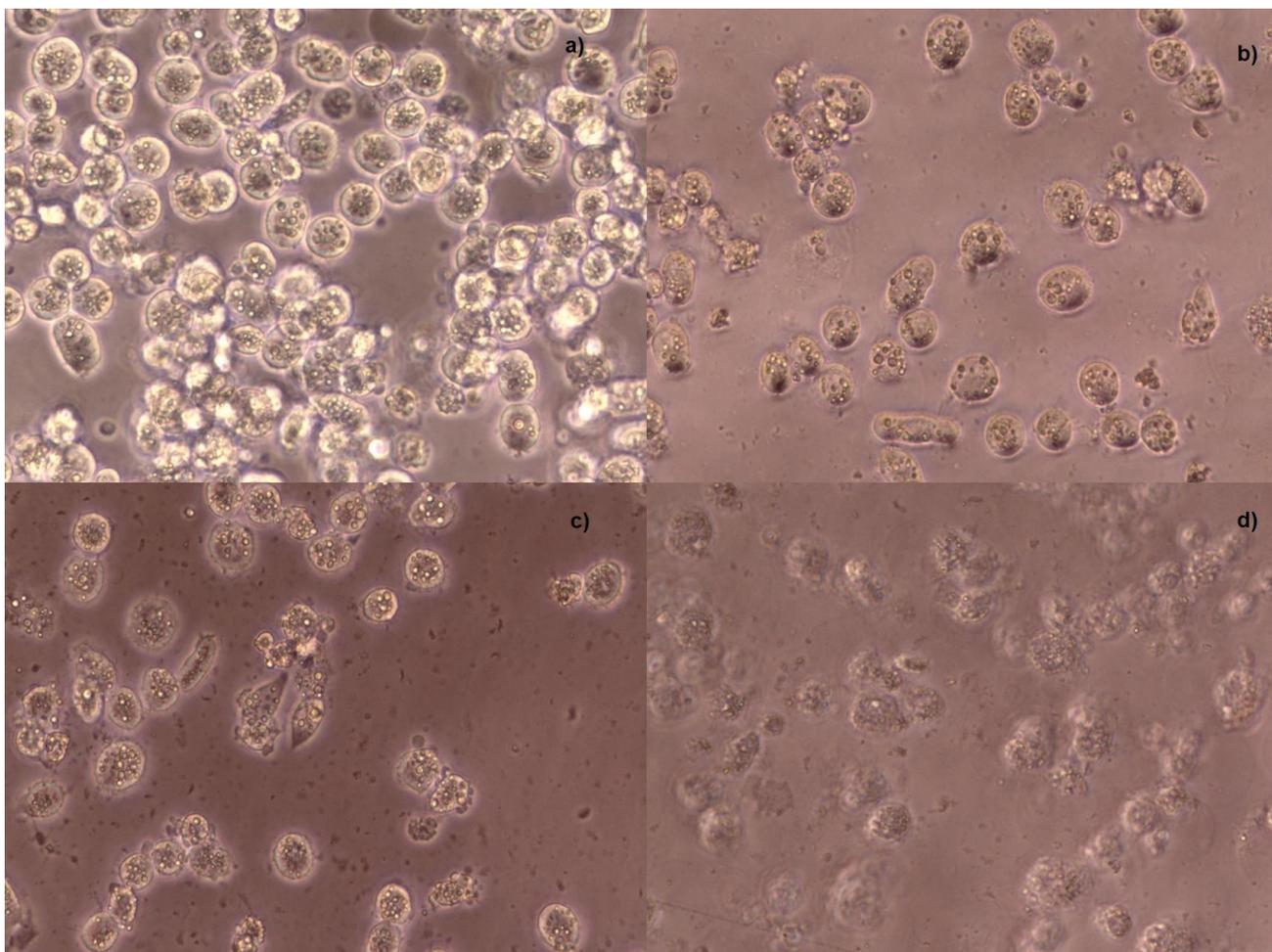
Línea celular Arpe-19, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (200 µg/mL), aumento 20X: a) *G. subincrustatum*; b) *G. weberianum*; c) *G. oerstedii* y d) *G. lucidum*



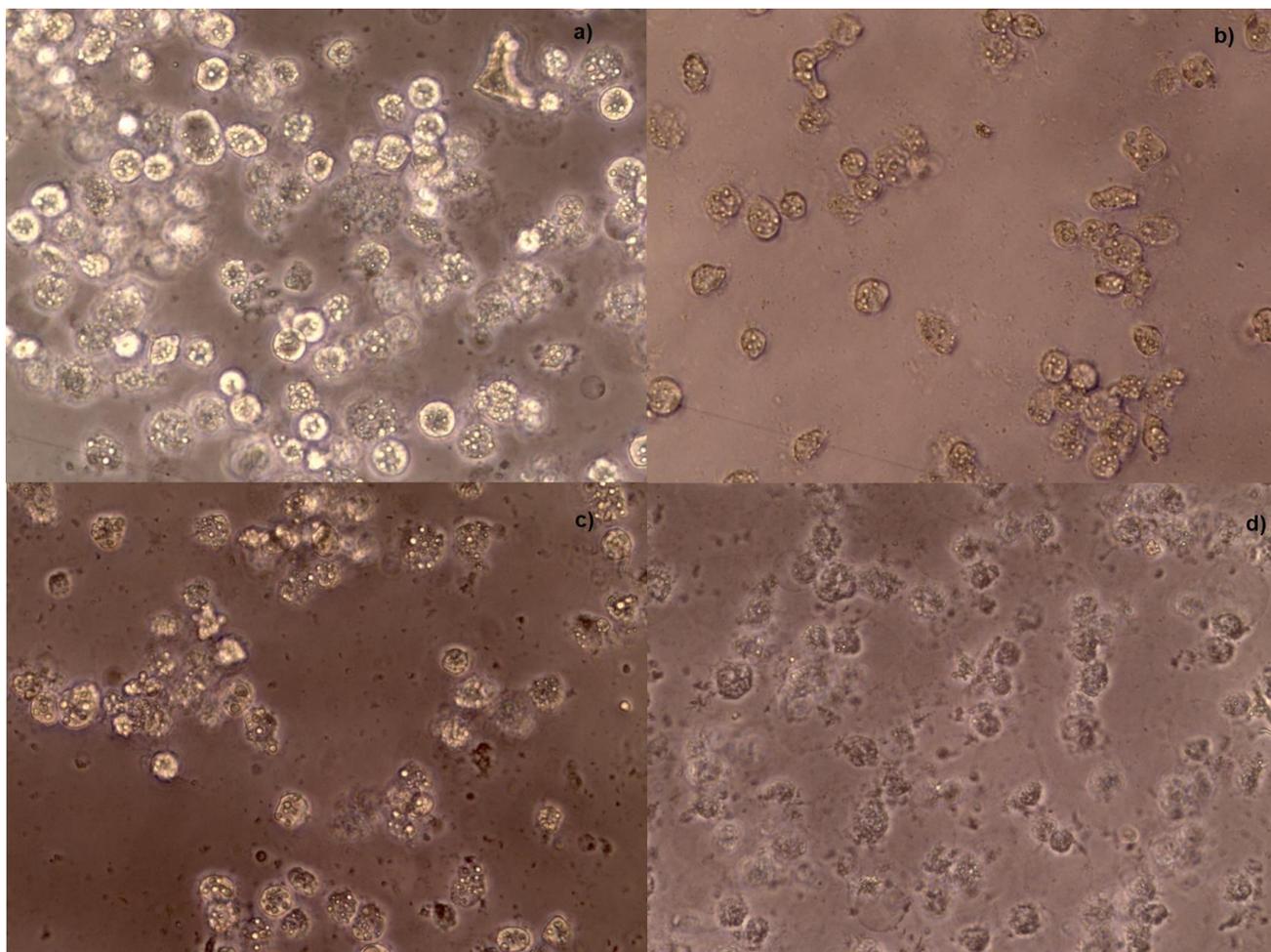
Línea celular Hela, 24 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (100-200  $\mu\text{g/mL}$ ), aumento 10X: a)-b): *G. subincrustatum*; c)-d): *G. weberianum*; e)-f): *G. oerstedii* y g)-h): *G. lucidum*



Línea celular Hela, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (100-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), aumento 10X: a)-b): *G. subincrustatum*; c)-d): *G. weberianum*; e)-f): *G. oerstedii* y g)-h): *G. lucidum*

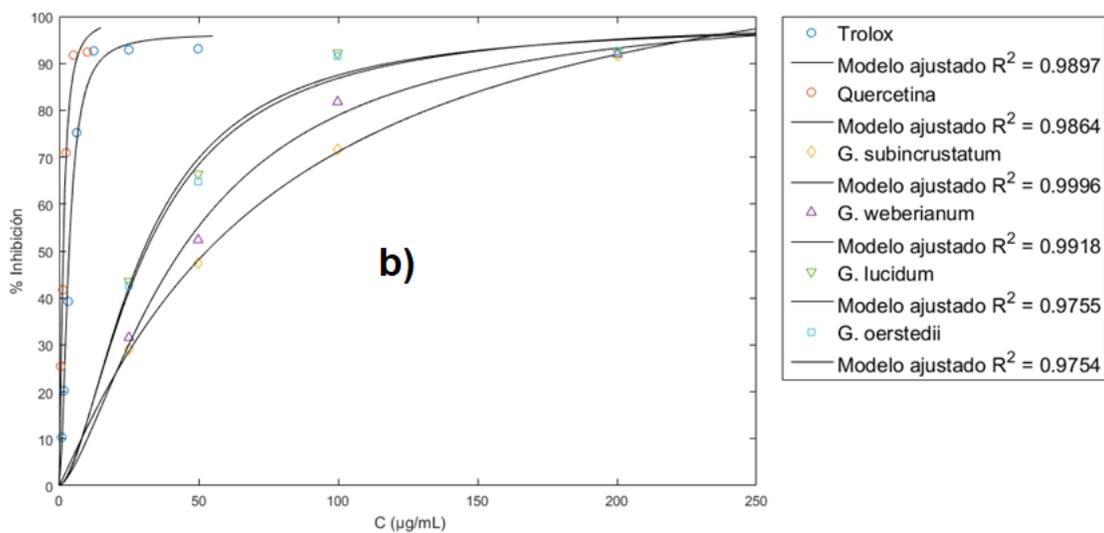
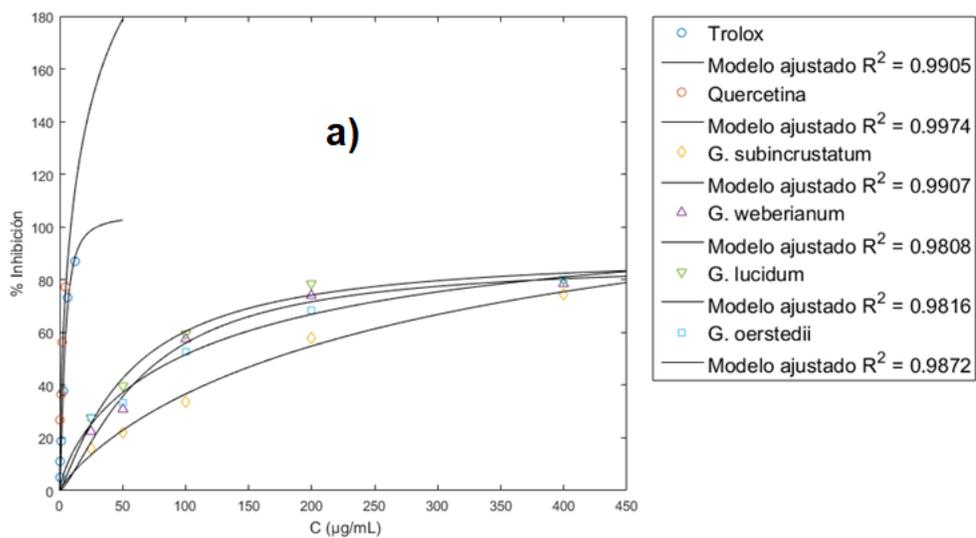


Línea celular Hela, 24 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), aumento 20X: a) *G. subincrustatum*; b) *G. weberianum*; c) *G. oerstedii* y d) *G. lucidum*



Línea celular Hela, 48 h de aplicado el tratamiento con extracto de *Ganoderma* (200 µg/mL), aumento 20X: a) *G. subincrustatum*; b) *G. weberianum*; c) *G. oerstedii* y d) *G. lucidum*

**Anexo C: Ajuste del modelo farmacodinámico a los datos experimentales: a) Ensayo DPPH y b) Ensayo ABTS.**



## Anexo D: Correlación entre compuestos fenólicos y la actividad antioxidante

