



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**T E S I S**

**Obtención de extractos de *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.)  
Karst, con solventes de diferente polaridad y cuantificación de  
polisacáridos en las fracciones acuosa y etanólica**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**DAVID PABLO IBARRA SIERRA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**BIOL. VÍCTOR MANUEL ESPARZA MARTÍNEZ**

**PLANTA PILOTO Y LABORATORIO PARA LA ENSEÑANZA EN LA PRODUCCION  
DE HONGOS COMESTIBLES Y MEDICINALES CULTIVADOS, PROYECTOS  
PRODUCTIVOS, JARDIN BOTÁNICO**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

No conoceré el miedo. El miedo mata la mente. El miedo es el pequeño mal que conduce a la destrucción total. Afrontaré mi miedo. Permitiré que pase sobre mí y a través de mí. Y cuando haya pasado, giraré mi ojo interior para escrutar su camino. Allí por donde mi miedo haya pasado ya no quedará nada, sólo estaré yo.

(Antoine De Saint Exupery)

---

POR MÍ SE VA HASTA LA CIUDAD DOLIENTE,  
POR MÍ SE VA AL ETERNO SUFRIMIENTO,  
POR MÍ SE VA A LA GENTE CONDENADA.

LA JUSTICIA MOVIÓ A MI ALTO ARQUITECTO.  
HÍZOME LA DIVINA POTESTAD,  
EL SABER SUMO Y EL AMOR PRIMERO.

ANTES DE MÍ NO FUE COSA CREADA  
SINO LO ETERNO Y DURO ETERNAMENTE.  
DEJAD, LOS QUE AQUÍ ENTRÁIS, TODA ESPERANZA

(La Divina Comedia, Canto III (Infierno)- Dante Alighieri)

---

Alicia miró alrededor suyo con gran sorpresa.

-Pero ¿cómo? ¡Si parece que hemos estado bajo este árbol todo el tiempo! ¡Todo está igual que antes!

-¡Pues claro que sí! -convino la Reina-. Y, ¿cómo si no?

-Bueno, lo que es en mi país -aclaró Alicia, jadeando aún bastante, cuando se corre tan rápido como lo hemos estado haciendo y durante algún tiempo, se suele llegar a alguna otra parte...

-¡Un país bastante lento! -replicó la Reina-. Lo que es aquí, como ves, hace falta correr todo cuanto una pueda para permanecer en el mismo sitio. Si se quiere llegar a otra parte hay que correr por lo menos dos veces más rápido.

**(Referencia para la hipótesis de la Reina roja, Alicia a través del espejo-Lewis Carrol)**

---



**Visto a la luz de la evolución, la biología es, quizás, la ciencia más satisfactoria e inspiradora. Sin esa luz se convierte en un montón de hechos varios, algunos de ellos interesantes o curiosos, pero sin formar ninguna visión conjunta.**

(Theodosius Dobzhansky)

**DEDICATORIA:**

**A la misma vida, porque con ella alcancé este objetivo.**

*Al Biólogo Víctor Manuel Esparza Martínez.*

## **AGRADECIMIENTOS:**

### ➤ **A mi familia:**

- A mi mamá (Bernarda Sierra Soto) y a mi papá (José Maximino Pablo Ibarra Sosa) por haberme dado vida y ayudarme en ella, sé que les he causado muchos problemas, pero les agradezco de todo corazón el quererme, regañarme y guiarme a lo largo de mi vida.
- A mis hermanos (Cruz de Jesús Ibarra Sierra y Víctor Guadalupe Ibarra Sierra), porque también les causé muchos problemas, pero me aguantaron y me ayudaron en muchas cosas.
- A mi novia (Raquel Peña López) porque nunca creí encontrar a una personita tan maravillosa, eres muy importante para mí, parecerá que es corto el tiempo a tu lado, pero a pesar de ello, te agradezco el apoyarme y estar conmigo en todo, yo también estaré contigo en todo lo que tú te propongas.
- A mis amigos (Arléth Valeria Castro Escalona, Jonás Eliú Colín González Y Jorge Ernesto Medina Escalante) porque ustedes son los mejores amigos que he tenido, los considero como mis hermanos porque me han ayudado estos años que los he conocido.
- Y al resto de la familia, que a pesar de que nos hemos distanciando, saben que les guardo un respeto y recuerdo los momentos que pase con ustedes.

### ➤ **A mis amigos:**

- No mencionaré sus nombres porque sería una falta de respeto, ya que pondría a unos y a otros no, los resumiré en mis amigos de la infancia, del CCH, del Taller de fibra de vidrio, del Soriana, de la Universidad: los de la carrera de biología, de la carrera de psicología, de la carrera de optometría, del Gimnasio y algunos del personal de la misma, que por mínimo que sea, me enseñaron algo o me brindaron su amistad, posiblemente no vean esto pero saben que cuentan conmigo.

### ➤ **A mis sinodales:**

- A la Maestra en Ciencias Irma Delfín Alcalá, fue corto el tiempo en que trabaje con usted, pero en cada momento pude observar su fascinación e interés para que aprendiéramos
- 
- Al Doctor Rafael Villalobos Molina, por brindar su apoyo, en todos los aspectos del proyecto.
- Al Doctor Luis Arturo Baiza Gutman, por enseñarme en este proyecto muchas cosas que no sabía, así mismo por la paciencia que me tuvo.
- Al Maestro en Ciencias Luis Antonio Hernández González por sus asesorías en el proyecto.

Al Sistema Nacional de Investigadores (S.N.I.), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme apoyo económico



## ÍNDICE:

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
Objetivo general	9
Objetivos particulares	9
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
Cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i> in vitro	10
Cultivo en medio sólido	10
Cultivo del micelio para la obtención del cuerpo fructífero	10
Cultivo en medio líquido	11
Remoción y desecación del micelio	11
Extracciones químicas	11
Extracción con etanol al 50%	11
Extracción con cloroformo, metanol y agua (extracto acuoso)	12
Cuantificación de polisacáridos	12
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>13</b>
Pruebas preliminares	13
Desarrollo de cuerpo fructífero	14
Cultivo en medio líquido	14
Extracciones químicas	15
Cuantificación de polisacáridos	18
Muestras de extracto acuoso	19
Muestras de extracto etanólico	20
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>22</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>23</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>28</b>
Anexo 1. Determinación de carbohidratos, Método de DoBois	28
Curva patrón	29
Anexo 2. Cálculo de cantidad de polisacáridos en las muestras	30
Muestra 1-acuosa	30
Muestra 2-acuosa	30
Muestra 3-acuosa	30
Muestra 1-etanol 50%	31
Muestra 2-etanol 50%	31
Muestra 3-etanol 50%	31



## RESUMEN

Los hongos del Phylum Basidiomycota constituyen un grupo importante, ya que sintetizan componentes químicos con un alto potencial médico; siendo *Ganoderma lucidum* un ejemplo, ya que sus compuestos presentan diversas actividades terapéuticas, de los que destacan los polisacáridos. En el presente trabajo se obtuvieron extractos del micelio y cuerpo fructífero de *G. lucidum* con disolventes de menor a mayor polaridad: cloroformo, metanol, agua y adicionalmente otro extracto con etanol al 50% partiendo del material crudo; en los dos últimos extractos se cuantificaron polisacáridos por el método de DuBois. La producción de micelio fue más reproducible que la del cuerpo fructífero. Con respecto a la cantidad de polisacáridos, ambos extractos, acuoso y etanólico presentaron variación; sin embargo, se obtuvo un mayor rendimiento en el extracto acuoso ( $8.6 \pm 2.4$  mg/g de peso seco) que en el etanólico ( $1.3 \pm 0.85$  mg/g de peso seco), partiendo de la masa inicial de micelio. Para la obtención de polisacáridos u obtener una fracción rica en ellos de *G. lucidum* se recomienda partir del cultivo de micelio y realizar un extracto acuoso.

Palabras clave: *Ganoderma lucidum*, micelio, cuerpo fructífero, disolvente, cloroformo, etanol, metanol agua, polisacáridos.

## INTRODUCCIÓN

Los principios bioactivos naturales, son compuestos químicos originados por la biosíntesis de materia que asimila en un organismo en su nutrición. Estos se pueden clasificar en compuestos del metabolismo primario y los compuestos del metabolismo secundario; los primeros intervienen en forma directa en el mantenimiento, crecimiento y reproducción del organismo, que incluye a los carbohidratos (monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos), lípidos (ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos, colesterol, aceites y triterpenos), aminoácidos y proteínas; mientras que los del segundo grupo, son estratégicos para la adaptación al medio, como: heterósidos (antraquinónicos, cardiotónicos, fenólicos, flavónicos), polifenoles (ácidos fenólicos, cumarinas; flavonoides, taninos, quinonas) y alcaloides (Bruneton, 1999; Muñoz, 2002). Todos estos compuestos han sido ocupados en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades, señalándose cerca de 1, 000,000 de principios bioactivos utilizados, siendo los vegetales los más estudiados y de los que más compuestos se extraen (Brizuela, 1998; Zhang *et al*, 2003; Hongbo *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2004; Lenis *et al*, 2007; Cárdenas, 2009).

Sin embargo, una fuente importante de principios bioactivos, poco explorada, la constituyen los hongos del Phylum Basidiomycota; ya que éstos poseen un gran potencial para obtener compuestos de interés terapéutico (Brizuela, 1998 & Wasser, 2002). Se ha determinado una amplia gama de actividades en sus productos naturales, como: antitumoral e inmunomoduladora, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, citostática, enzimática, nutricional, alucinógena y venenosa. Estas características han favorecido, a que más países los apliquen en tratamientos y realicen investigaciones sobre ellos (Brizuela, 1998 & Ruiz *et al.*, 1999).

En particular, los  $\beta$ -glucanos (polímeros de D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -glicosídicos) extraídos de la pared celular de estos hongos, han mostrado actividad inmunomoduladora, anticancerígena-tumoral e hipoglucemiante (Wasser, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Pérez, 2006; Pontón, 2008). Estos polisacáridos difieren en composición química de los otros  $\beta$ -glucanos presentes en vegetales y animales, ya que poseen enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) en la cadena principal y enlaces adicionales  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) en puntos de ramificación (Wasser, 2002).

Principalmente, los polisacáridos de *Ganoderma lucidum*, (denominado “Reishi” en Japón, “Lingzhi” en China, “Pipa” en España y “flor de tierra” en Latinoamérica), han mostrado tener

estas actividades (Sheng-Yuan *et al.*, 1997; Hongbo *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004; Uña, 2006). Se distinguen hasta 6 variedades de este hongo y según el color predominante deriva un uso medicinal específico como: analgésico, antialérgico, preventivo del asma y bronquitis (expectorante y antitusivo), antibacteriano (especialmente activo frente a estafilococos y estreptococos), antioxidante eliminando los radicales hidroxilo libres que son los causantes del envejecimiento y muerte celular, actividad anticancerígena-tumoral, efecto antiviral (induciendo la producción de defensas inespecíficas e interferón), acción hipotensora y cardiotónica (favorece el metabolismo miocárdico, mejorando la hemodinámica coronaria y disminuyendo el colesterol), protector y desintoxicante hepático (anti-hepatitis B), protección frente a las radiaciones ionizantes (Miyazaki *et al.*, 1981; Uña, 2006).

Esto ha propiciado el desarrollo de técnicas de cultivo, donde se considera el suministro de nutrientes sin someter a los hongos a estrés, para producir una mayor cantidad de biomasa en un corto periodo y así tener una mayor cantidad de material biológico, para su aplicación e investigación científica. Entre las técnicas de cultivo se puede mencionar las que emplean medios sólidos (agar + nutrientes + agua), que sirven para propagar y aumentar la cantidad de dicho material, y los medios líquidos (nutrientes + agua), que son de gran utilidad para separar la biomasa del medio y emplearla para la extracción de metabolitos (Gaitán *et al.*, 2006; Garza *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009).

Con respecto a la técnica de extracción de los principios bioactivos, se utiliza un solvente que por su polaridad y su estructura química, arrastre a los compuestos con las mismas propiedades químicas, mediado por las fuerzas de atracción (enlaces ión-ión, enlace dipolo-dipolo (ejemplo: puente de hidrógeno), fuerzas de Van der Waals, enlace ión-dipolo), en relación a esto citamos la regla empírica que dice: “*Una sustancia disuelve a otra semejante*” (Morrison y Boyd, 1990).

Estos disolventes son agrupados, acorde a su polaridad, en dos grupos: disolventes apolares (o no polares) que son de tipo orgánico y cuyas moléculas tienen una distribución simétrica en la nube electrónica; por lo tanto, carecen de polos positivo y negativo, un ejemplo es el cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) que disuelve componentes lipídicos como esteroides y triterpenos. Y el otro grupo es el

de los disolventes polares, en donde la distribución de la nube electrónica es asimétrica en sus moléculas, por lo tanto, la molécula presenta un polo positivo y otro negativo; éstos a su vez se subdividen en disolventes polares próticos, que se caracterizan por poseer enlaces O-H o enlaces N-H, ejemplo de éstos serían etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) que disuelven polisacáridos y polifenoles; y los disolventes polares apróticos que no tienen enlaces O-H o N-H, como la acetona ( $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ ) (Morrison y Boyd, 1990; Turlo *et al.*, 2010).

En México, la diversidad de hongos es muy alta, se estima que existen 200,000 especies, conociéndose solo 4% (8,000 especies) entre las que destaca *Ganoderma lucidum* (Estrada *et al.*, 2009). Sin embargo, el uso medicinal de estos hongos es escasa en nuestro país, manifestándose sólo el interés gastronómico en algunos estados (Martínez *et al.*, 2007). En cuanto a la producción de hongos, ésta se remonta al año de 1933, en un rancho cercano a Texcoco en el Estado de México. Actualmente México, es el tercer país de América en dicha producción, antecedido por E.U.A. y Canadá, y es el primer productor comercial de Latinoamérica, siendo los géneros *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus* y *Grifola* los hongos más cultivados debido a su alto potencial para consumo alimenticio; y por último *Ganoderma* que actualmente se comienza a producir para uso curativo tradicional (Martínez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2007).

## ANTECEDENTES

Conrado *et al.*, (2002), cultivaron *Ganoderma lucidum* en bagazo de maguey tequilero para determinar si este sustrato era útil para obtener cuerpos fructíferos. Ensayaron dos tratamientos el primero enriquecido con cascarilla de algodón y el segundo enriquecido con cáscara de cacahuate, además del control que fue bagazo sin enriquecer. Los cultivos se incubaron a 28°C y se encontró que hubo mayor eficiencia biológica en la mezcla de bagazo con cascarilla de algodón. Los carpóforos obtenidos los deshidrataron, molieron y cribaron, para posteriormente preparar 3 tipos de extractos, para probarlos en la proliferación de linfocitos humanos. Un aumento de hasta 600% en los linfocitos se obtuvo en comparación con los grupos de control.

Hongbo *et al.*, (2002) realizaron un estudio donde determinaron el efecto del extracto de etanol al 95% de cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* en células de cáncer de mama (MCF-7), donde obtuvieron 35 gramos de material sólido al trabajar con 1000g de hongo en 1000ml de disolvente (1:1). El estudio estableció que hubo inhibición del crecimiento celular, dependiendo de la concentración de la dosis. Además, se reporta que este compuesto induce apoptosis en dichas células, proceso que podría ser mediado a través de la regulación de una proteína pro-apoptótica Bax y no por el sistema inmune.

Cui *et al.*, (2003) reportaron péptido-glucanos en el micelio de *Coriolus versicolor* en el extracto acuoso producido en un biorreactor en medio papa dextrosa (PD) enriquecido con nutrientes, obteniendo 18 kg/m<sup>3</sup> de peso seco. Se determinó la actividad inmuno-estimuladora, concluyendo que se deben de hacer más pruebas para determinar dicha acción.

Zhang *et al.*, (2003), separaron de la fracción acuosa del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* un péptido-glucano con un rendimiento de 0.82% de la masa inicial y de ese porcentaje el 93.5% fueron polisacáridos y el restante de 6.5% péptidos. Posteriormente lo aplicaron a células pancreáticas, a las que se les había inducido diabetes con aloxana, para determinar su efecto protector. Los resultados sugirieron que los polisacáridos son útiles en la protección al daño pancreático inducido con este químico.

Lu *et al.*, (2004) investigaron el efecto quimiopreventivo del extracto de etanol al 95% y acuoso del cuerpo fructífero y esporas de *Ganoderma lucidum* en un cultivo *in vitro* de células de cáncer de vejiga. Determinando que el extracto de etanol tiene un efecto mayor de inhibición en la proliferación de las células, por evitar el paso de la fase G2 a la M del ciclo celular.

Millán (2005), estableció un proceso de producción de *Ganoderma lucidum* utilizando como sustrato, paja de cereales (trigo, cebada) que previamente pasteurizadas. El sustrato fue colocado en bolsas de polietileno perforadas y sin filtro.

Zhou *et al.*, (2007) extrajeron polisacáridos de cuerpos fructíferos de *Colorius versicolor* por extracción en equipo Soxhlet con disolventes de diferente polaridad. Primero emplearon éter de petróleo como desengrasante del material biológico y posteriormente agua para remover los polisacáridos. El extracto acuoso, fue tratado con etanol al 95% para precipitar los polisacáridos, y las proteínas libres y el pigmento de los extractos fueron eliminados con carbón activo y por el método de Seville.

Turlo *et al.*, (2010) sembraron *Lentinula edodes* en medio líquido, enriquecido con selenio (Se), con el fin de determinar si este elemento afectaba la biosíntesis y composición de la pared y la membrana celular. La composición del extracto del micelio incluía exopolisacáridos (EPS), quitina, y esterol (ergosterol). Se aplicaron pruebas a los diferentes extractos: acuoso, metanólico y clorofórmico, que dieron como resultado que el medio enriquecido con Se ejerció potentes efectos sobre la composición de la pared y la membrana celular, y en el contenido de polifenoles que están involucrados en los procesos de desintoxicación. Los investigadores determinaron en su estudio, la concentración de Se que se requiere para el rendimiento, en el medio de cultivo, de inmuno-estimulantes activos y exopolisacáridos.

Ortiz (2011) estandarizó el cultivo de *Trametes versicolor* en sustratos lignocelulósicos: 1) aserrín de pino suplementado con sorgo, salvado, yeso y rastrojo, y 2) aserrín de encino suplementado con sorgo, salvado y yeso. El segundo tuvo una mayor eficiencia de producción. Además ensayó la producción de micelio en un medio de cultivo líquido extracto de malta (EM), observando que en este medio hubo una mayor producción de micelio, por lo que reportó las ventajas de esta técnica de cultivo de bajo costo, sin embargo hizo notar que es más posible el riesgo de contaminación.

Los trabajos mencionados son sólo una muestra de las investigaciones que se han realizado con basidiomicetes, tanto de su producción y extracción de polisacáridos; sin embargo, existen más investigaciones de otros principios bioactivos como: triterpenos, enzimas y ácido ganodérico en el caso de *Ganoderma lucidum*, que de igual forma presentan actividades terapéuticas. También deben resaltarse los hallazgos en trabajos informales, ya que éstas

fueron la base para dichas investigaciones y se resalta su empleo ancestral como tratamientos curativos tradicionales.

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que las investigaciones de las propiedades químicas de la variedad de *Ganoderma lucidum* existente en nuestro país son escasas, en este trabajo se pretendió, generar información de la cantidad de polisacáridos de dos fases de desarrollo de esta especie. Lo que contribuiría a promover más trabajos de otras especies de Basidiomicetos que también se encuentran en México.

Posteriormente permitiría realizar ensayos de la actividad que pueden presentar estos a un determinado padecimiento.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Obtención de extractos de *Ganoderma Lucidum*, con solventes de diferente polaridad y cuantificación de polisacáridos en las fracciones acuosa y etanólica

### **Objetivos particulares**

Determinar las mejores condiciones para el desarrollo de cuerpo fructífero de *G. lucidum*.

Evaluar la masa de micelio de *G. lucidum*, producida en medio líquido, dextrosa-papa.

Determinar el rendimiento de los extractos con los diferentes disolventes.

Calcular la cantidad de polisacáridos en los extractos acuoso y etanólico del micelio y del cuerpo fructífero de *G. lucidum*.

Comparar la cantidad de polisacáridos del micelio con los del cuerpo fructífero.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Cultivo de *Ganoderma lucidum* in vitro**

El cultivo de micelio se realizó en la planta piloto y laboratorio de la enseñanza en la producción de hongos comestibles y medicinales y proyectos productivos, del Jardín Botánico de la FES-Iztacala. La cepa de *Ganoderma lucidum* que se ocupó fue del mismo laboratorio. La siembra se realizó en una campana de flujo laminar, utilizando como material: pinzas de relojero y bisturí esterilizados (lavados con cloro (30%), limpiados con alcohol (70%) y expuestos a rayos UV durante 5 minutos) para inhibir el desarrollo de cualquier microorganismo.

### **Cultivo en medio sólido**

El medio de cultivo utilizado fue agar dextrosa-papa (PDA), que fue esterilizado en autoclave a 121°C (15 libras/in<sup>2</sup>) durante 25 minutos, para que después fueran colocados 15 ml en cada caja de Petri. La técnica de cultivo consistió en cortar piezas de 1 cm<sup>2</sup> de un pre-cultivo de esta cepa, para distribuirlos en la superficie del nuevo medio, colocándose en la cámara de incubación a 25°C, revisándose cada 2 días para observar el desarrollo del micelio o una posible contaminación. En total, se sembraron 60 cajas de Petri, siendo 10 días el tiempo promedio de desarrollo. Posteriormente estos cultivos fueron ocupados para inocular los cultivos en medios líquidos y “pasteles”.

### **Cultivo del micelio para la obtención del cuerpo fructífero**

Para la obtención del cuerpo fructífero se preparó un “pastel” de 500 g, que consiste en una mezcla heterogénea: de 380 g de aserrín de encino, 100 g de sorgo, 10 g de cebada, finalmente se adicionaron 10 g de yeso para ajustar el pH. Esta mezcla se colocó en bolsas de 1 kg, las cuales se esterilizaron en autoclave a 121°C (15 libras/in<sup>2</sup>) durante 1 hora.

El micelio se inoculó en la misma proporción que en el medio sólido. Posteriormente, los “pasteles” se colocaron en la cámara de incubación (a 25 °C y 60% de humedad), revisándose cada 2 días para observar el desarrollo del micelio o una posible contaminación.

Una vez que el micelio invadió completamente el “pastel”, éste se trasladó a la zona de fructificación, con una temperatura de 25 °C, y fueron regados cada tercer día.

### **Cultivo en medio líquido**

Para preparar el medio líquido se utilizó dextrosa-papa (PD), agregando 10 g del medio en 250 ml de agua destilada, se colocó en contenedores de 500 ml. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C (15 libras/in<sup>2</sup>) durante 25 minutos. La inoculación del micelio fue igual que en el medio sólido, sólo que se dejó en suspensión en el nuevo medio. Después, los frascos se colocaron en la cámara de incubación a 25°C, revisándose cada 2 días para observar el desarrollo del micelio o una posible contaminación. Después de 20 días el micelio propagado se removió por filtración a través de papel filtro de poro grande.

### **Remoción y desecación del micelio**

Se pesó para determinar la masa fresca una vez que se retiró del medio líquido, posteriormente se puso en una cámara de secado sometiendo a 45°C constante durante 5 días, finalmente se volvió a pesar para determinar la cantidad de peso seco y se ocupó en las extracciones químicas.

### **Extracciones químicas**

Se efectuaron en el laboratorio de Química (cabecera L-421), utilizando disolventes ordenados por polaridades (menos polar - más polar). Debido a que en la bibliografía consultada, se mencionan diversas proporciones de masa/disolvente y diferentes procesos de extracción, en este trabajo se utilizaron dos de las técnicas reportadas en trabajos previos.

### **Extracción con etanol al 50%**

La técnica que a continuación se menciona corresponde a una modificación en la implementada por Hongbo *et al.*, (2002).

Se colocaron 20 ml de etanol al 50% en recipientes de vidrio color ámbar, adicionándoles 2 g del material biológico (proporción 1g:10ml), manteniéndoles a temperatura ambiente durante 20 días. Al término de ese tiempo, se filtró el sólido, obteniéndose 7ml de extracto. Para eliminar cualquier partícula sólida del filtrado, se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 minutos, el material resultante se guardó en frascos color ámbar, congelándose a -5°C para posteriormente realizar la cuantificación de polisacáridos.

### **Extracciones con cloroformo, metanol y agua (extracto acuoso)**

En este caso se ocupó la misma cantidad de material biológico, y en cada extracción la pérdida de materia correspondió al material extraído. El volumen del disolvente usado en todos los casos fue de 200 ml y la masa inicial de 4g. Esta técnica se implementó debido al proceso que detallaron Zhou et al., (2007) y Turlo *et al.*, (2010), donde describen que el cloroformo extrae compuestos lipídicos o de menos polaridad, mientras que el metanol remueve compuestos con polaridad intermedia o moléculas que poseen una parte polar y otra no polar, contribuyendo a la mejor extracción de polisacáridos más puros.

La extracción con cloroformo y metanol fue en el equipo Soxhelt. En ambos casos la extracción duró 1 hora; se eliminó el disolvente por destilación, dejando un volumen aproximado de 50 ml. El material resultante se guardó en frascos color ámbar y se eliminó el disolvente a temperatura ambiente por evaporación, concentrándose el extracto.

Para el extracto acuoso, la muestra se colocó directamente en un vaso de precipitados, dejando hervir 1 hora. Finalmente se concentró hasta 100 ml y se guardó en frascos color ámbar para ser congelado a  $-5^{\circ}\text{C}$  para su mantención y posterior cuantificación de polisacáridos.

### **Cuantificación de polisacáridos**

La cuantificación de los polisacáridos se realizó sólo en los extractos acuoso y etanólico, ya que estos disolventes son polares por lo que tienen afinidad por los carbohidratos. El método que se utilizó para dicha determinación fue el de DoBois (fenol-ácido sulfúrico) (DuBois *et al.*, 2002) (ver anexo 1).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas preliminares

Se realizaron 2 extracciones, una con la masa de un cuerpo fructífero silvestre y la otra con el micelio cultivado en extracto de malta (EM), por 20 días. El cuerpo fructífero, presentó el mayor rendimiento, con valores de 31.5% con cloroformo, los extractos metanólico y acuoso representaron el 8.7% en ambos casos (ver cuadro 1).

Material biológico	Masa inicial (g)	Peso del material removido con cloroformo (g)	Peso del material removido con metanol (g)	Peso del material removido con agua (g)
Micelio	4	0.26 (6.5%)	0.06 (1.5%)	0.01 (0.3%)
Cuerpo fructífero	4	1.26 (31.5%)	0.35 (8.7%)	0.35 (8.7%)

Cuadro 1: Peso de los extractos con solventes de diferentes polaridades, del cuerpo fructífero silvestre y micelio cultivado en extracto de malta, el porcentaje de cada peso el rendimiento de la extracción.

Por el contrario, las cantidades de material removido con etanol 50% se comportaron de diferente manera, ya que en este caso el micelio presentó la mayor cantidad de material removido, representando el 10.3% de rendimiento (ver cuadro 3).

Material biológico	Masa inicial (g)	Peso del material removido con etanol 50% (g)
Micelio	4	0.41 (10.3%)
Cuerpo fructífero	50	3.68 (7.40%)

Cuadro 2: Peso de los extractos con etanol al 50%, del cuerpo fructífero silvestre y micelio cultivado en extracto de malta, el porcentaje de cada peso representó el rendimiento de la extracción.

A pesar de que solo en el extracto etanólico al 50% se obtuvo mayor cantidad de material removido del micelio, se consideró que es más viable su utilización en este proyecto por su tiempo de desarrollo, ya que se obtiene en menos tiempo.

### **Desarrollo de cuerpo fructífero**

Se realizaron 15 siembras en “pasteles”, el tiempo promedio de propagación del micelio fue de 30 días y el tiempo en el que aparecieron los primordios fue de 60 días; sin embargo, ninguno obtuvo un diámetro mayor a 1 cm y algunos de ellos presentaron desarrollo de *Penicillium*.

Se puede mencionar que el tiempo en el que aparecieron los primordios se ajustó al rango de 63-69 y 70 días reportado por Conrado *et al.*, (2002); sin embargo, el tiempo de propagación del micelio fue de 15 días en su trabajo, siendo la mitad del obtenido en esta investigación. Cabe resaltar que Conrado *et al.*, emplearon diferentes sustratos (suplementados) al nuestro, lo que nos permite suponer que se debería de hacer una evaluación de los nutrientes que requiere el hongo para su desarrollo y así suplementar mejor un medio de cultivo.

En consideración con las sugerencias del cultivo de *Ganoderma lucidum* por Millán (2005) que estableció que los carpóforos de esta especie, no deben de regarse hasta que alcancen un tamaño de 4 cm de diámetro, ya que si son regados antes son más propensos a ataques de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., lo que no se consideró como factor en el momento de trasladarlos a la zona de fructificación, ya que éstos fueron regados desde que aparecieron en el medio lo que contribuyó a que no alcanzaran una mayor talla.

### **Cultivo en medio líquido**

Se realizaron 60 siembras, el tiempo promedio de desarrollo fue de 20 días, del total sólo se ocuparon 22 para obtención de materia seca, las variaciones de peso de cada micelio por la pérdida de agua representó el 95% del peso húmedo (ver cuadro 3).

Cui *et al.*, (2003), realizaron cultivos en el medio PD, pero enriquecido con más fuentes de nutrientes (sales, compuestos nitrogenados) obteniendo mayor cantidad de micelio en menos espacio, lo que permite establecer que nuestro medio contenía menos nutrientes asimilables para el desarrollo del micelio, lo que podría haber influido en las diferencias de masa obtenida en cada siembra. Además, como lo estableció Ortiz (2011), la manipulación en estos medios de cultivo debe de ser controlada, ya que una distracción en su cuidado provocaría una contaminación, como se presentó en algunas siembras. Sin embargo, el medio contribuyó al desarrollo, lo que nos permite sugerir que este es más conveniente solo para su mantención.

Contenedor	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	% de pérdida de H <sub>2</sub> O
1	21.4	1.6	93
2	32.5	1.7	94
3	45	2.3	95
4	23.8	1.6	93
5	28.5	1.7	94
6	8	0.5	94
7	16.5	1.4	92
8	16.9	1.1	93
9	15.3	0.8	95
10	7.1	0.4	94
11	9.2	0.59	94
12	21.9	0.74	97
13	11.8	0.83	93
14	10.1	0.32	97
15	12.9	0.59	95
16	8.8	0.29	97
17	28.3	1.09	96
18	22.4	0.95	96
19	20.1	0.6	97
20	37.8	1.06	97
21	10.1	1.1	89
22	12.8	0.8	94
suma	421.2	22.06	--
promedio	19.14	1.002	95
Desviación estándar.	10.26	0.52	1.98

Cuadro 3: Peso húmedo y peso seco del micelio de cultivos de *G lucidum* en medio líquido, el porcentaje representa la pérdida de H<sub>2</sub>O.

### Extracciones químicas

Los ensayos de extracción con los 4 disolventes en el micelio cultivado en PD, presentaron poca variación; el extracto acuoso tuvo el mayor rendimiento, con 11.5%, seguido del metanólico con 4.25% y el clorofórmico con 3.3% (Ver cuadro 4).

Estos porcentajes fueron menores a los obtenidos por Turlo *et al.*, (2010), en el grupo control de sus cultivos de micelio de *Lentinula edodes*, además de que sus porcentajes fueron mayores en los extractos clorofórmicos con 12.9%, metanólico con 33.5% seguido del extracto acuoso con 7.74%, lo que indica que entre estas 2 especies existen diferencias en composición química.

Ensayos	Masa inicial (g)	(Tratamiento 1) Peso del material removido con cloroformo (g) y porcentaje	(Tratamiento 2) Peso del material removido con metanol (g) y porcentaje	(Tratamiento 3) Peso del material removido con agua (g) y porcentaje
1	4	0.13 (3.3%)	0.20 (5%)	0.4 (10%)
2	4	0.13 (3.3%)	0.17 (4.25%)	0.47 (11.75%)
3	4	0.13 (3.3%)	0.15 (3.75%)	0.51 (12.75%)
medias		0.13 (3.3%)	0.17 (4.25%)	0.46 (11.5%)
Desviación estándar		0	0.025	0.055

Cuadro 4. Peso de los extractos del micelio cultivado en PD, con solventes de diferente polaridad, el porcentaje establece el rendimiento de la extracción.

Las cantidades de material removido con etanol al 50% del micelio cultivado en PD, tuvieron una mínima variación, cabe señalar que en los ensayos el material biológico absorbió 65% del solvente, dando como extracto final 7 ml (ver cuadro 5). De igual manera que la de los datos del micelio cultivado en extracto de malta, éstos fueron superiores a los del cuerpo fructífero.

Cabe mencionar que los antecedentes consultados no emplean este tipo de extracción, sólo en pocas investigaciones como la de Hongbo *et al.*, (2002), utilizaron etanol al 95% en proporción a la masa 1:1, también es el único trabajo previo que reportó la cantidad de extracto obtenida que fue de 35g, partiendo de una masa inicial de 1000g, lo que representó el 3.5% de rendimiento, aunque la proporción de etanol no fue la misma, también en este caso este valor fue menor al del micelio.

En este caso, basado en Morrison (1990) se puede mencionar que utilizar el etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) contribuye a la remoción de polisacáridos, que están asociados a moléculas menos polares, ya que su molécula posee una parte no polar ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ) y otra polar (OH). En comparación con etanol al 50% que además de poseer la parte no polar ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), la parte polar tiene una mayor proporción (OH- $\text{H}_2\text{O}$ ) y puede remover mas compuestos polares.



Ensayo	Masa inicial (g)	(Tratamiento 4) Peso en g del material removido con etanol 50% y porcentaje.
1	2	0.17 (8.5%)
2	2	0.18 (9%)
3	2	0.17 (8.5%)
<b>Promedio</b>		<b>0.17 (8.5%)</b>
<b>Desviación estándar</b>		<b>0.0057</b>

Cuadro 5. Peso de los extractos con 20 ml de etanol al 50% en 2 gramos de micelio cultivado en PD, en los 3 casos se obtuvo 7 ml de extracto. El porcentaje establece el rendimiento de la extracción.

Las desviaciones estándar del conjunto de datos establecen poca variación en los procesos de extracción, indicando que la mayor cantidad de extracto se presentó en el acuoso y la menor cantidad fue en el extracto clorofórmico (ver figura 1).

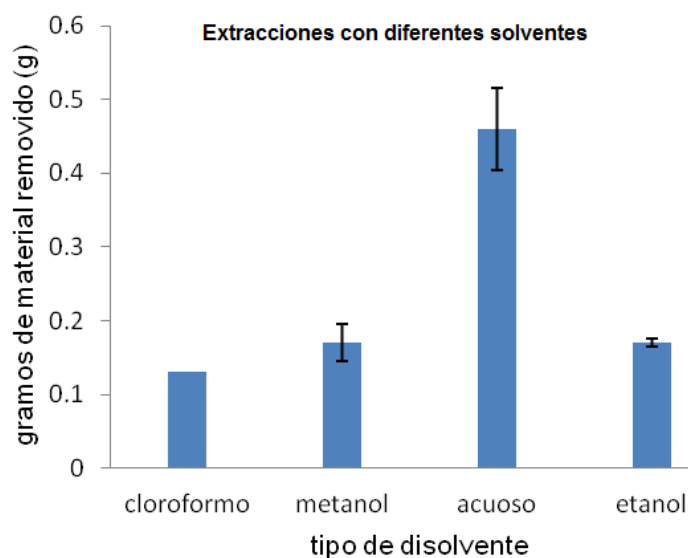


Figura 1: Material extraído con cada disolvente. Las barras representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de las extracciones, estableciendo la variación en el proceso de extracción.

## Cuantificación de polisacáridos

Como se mencionó en la metodología, esta prueba se realizó exclusivamente en los extractos acuoso y etanólico, ya que su polaridad tiene afinidad por este tipo de moléculas.

Cabe mencionar que la curva puede realizarse con cualquier carbohidrato; sin embargo, en este trabajo se decidió realizarla con el polisacárido “dextran”, ya que es el más utilizado en este tipo de investigaciones.

Asimismo, las reacciones de coloración que presentaron las muestras, fueron las establecidas por DuBois *et al.*, (2002). Con base en la fórmula de regresión lineal ( $Y=\beta_0+\beta_1X$ ), el coeficiente  $r^2$  mostró 99% de confiabilidad de los datos, explicando el modelo de regresión lineal en todas las curvas de cuantificación.

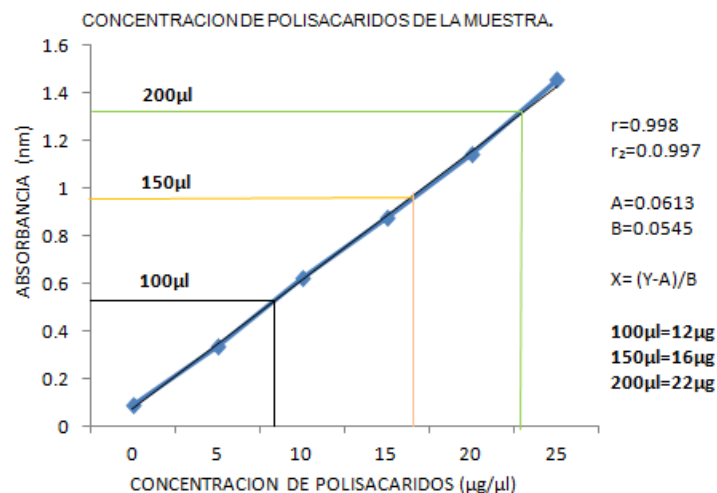


Figura 2: Curva estándar de polisacáridos vs absorbancia. Interpolación de las alícuotas (µl) y cálculo de regresión lineal para determinar la cantidad de polisacáridos en las muestras.  $r^2$  representa el coeficiente de determinación, “A o  $\beta_0$ ” es la intersección de la línea con el eje y “B o  $\beta_1$ ” es la pendiente de la línea.

El cálculo de polisacáridos se realizó preparando 1 ml de extracto, disolviendo en un volumen NaOH, para tomar alícuotas de diferentes cantidades y cuantificar los polisacáridos en cada una de ellas; posteriormente, se hizo la relación de esas cantidades al volumen total del NaOH ocupado, con ese dato, se calculó el volumen total del extracto (el cálculo de todas las muestras se puede apreciar en el anexo 5).

Volumen de la alícuota (proporción de la alícuota)	Cantidad de polisacáridos en el total de extracto (4g/100ml)
100µl (1:10)	0.005g
150µl (1.5:6.6)	0.005940g
200µl (2:5)	0.0065g
Promedio	0.00581g
Cantidad de polisacáridos (1g/25ml)	0.00145g

Cuadro 7. Representación del cálculo de polisacáridos en el total de volumen de extracto, tomando como referencia que se determinó la cantidad en 3 volúmenes diferentes de alícuotas.

### Muestras de extracto acuoso

Las muestras presentaron mucha variación de polisacáridos cuantificados, cabe resaltar que en la muestra 2 tuvo que modificarse la cantidad de solvente (Sol. 1M de NaOH), por la mayor concentración de polisacáridos que tenía, dando por resultado 0.86% de rendimiento siendo el valor más alto y por ende la mejor extracción.

El promedio de polisacáridos extraídos por gramo de tejido representó el 0.41% de la masa inicial, exactamente el 50% menos de los polisacáridos en el cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* que obtuvieron Zhang *et al.*, (2003), con un valor de 0.82%, que nuevamente lo refirió en otro trabajo posterior (Zhang *et al.*, 2004).

En referencia a lo mencionado en el cultivo en medio líquido, de la disponibilidad de nutrientes, establecemos que la variación entre cuerpo fructífero y micelio disminuiría, ya que las deficiencias nutricionales podrían establecer esa variación y la respuesta al desarrollo de cada micelio, lo que se observa en el caso de la muestra 2 de esta extracción (ver cuadro 8).

<b>Extracción acuosa</b>	<b>Cantidad de polisacáridos (1g/25ml) (g)</b>
1	0.0015 (0.15%)
2	0.0086 (0.86%)
3	0.0024 (0.24%)
<b>Promedio</b>	<b>0.0041 (0.41%)</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0.0038</b>

Cuadro 8. Cantidad de polisacáridos en el extracto acuoso, en 1g de tejido. El porcentaje establece el rendimiento de la extracción.

### **Muestras de extracto etanólico**

A diferencia de los polisacáridos de las muestras acuosas, los polisacáridos cuantificados en los extractos etanólicos mostraron poca variación. De la misma manera, se tuvo que incrementar la cantidad del solvente (Sol. 1M de NaOH); en este caso la cantidad de polisacáridos removidos por gramo de tejido representó el 0.11% de rendimiento (ver Cuadro 9).

Como se mencionó, ninguno de los antecedentes hace referencia a la extracción con etanol al 50%; sin embargo, indican que se puede obtener el extracto en un tiempo menor al que se planteó en esta investigación, como lo mencionan Hongbo *et al.*, (2002), donde señalaron que su extracto lo obtuvieron en 24 horas, o en el caso de Lu *et al.*, (2004), que lo obtuvieron en 30 minutos sometándolo a agitación constante, lo que ayudo a la remoción más rápida de los compuestos; esto nos permite establecer que en la extracción con etanol al 50% no necesariamente se requiere dejar un tiempo prolongado para ser eficiente, sino que en menos tiempo se podría extraer la misma cantidad de compuestos, además de que si se somete a agitación disminuiría el tiempo por el constante movimiento del solvente al interactuar con las moléculas del material biológico.

Por tal motivo, con los antecedentes, no se puede hacer una comparación de la cantidad de polisacáridos que se obtuvieron con este disolvente.

<b>Extracción con etanol 50%</b>	<b>Cantidad de polisacáridos (1g/10ml) (g)</b>
1	0.00085 (0.085%)
2	0.0013 (0.13%)
3	0.0012 (0.12%)
<b>promedio</b>	<b>0.0011 (0.11%)</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0.0002</b>

Cuadro 9. Cantidad de polisacáridos en extracto etanólico, en 1g de tejido. El porcentaje establece el rendimiento de la extracción.

En comparación, las cantidades de polisacáridos entre extractos etanólico y acuoso, los extractos acuosos presentaron mayor cantidad de polisacáridos; sin embargo, la prueba de  $t$  (hipótesis bilateral) determinó que no existen diferencias significativas entre los 2 extractos, ya que el valor de  $t_0 = -1.36$  y el valor en tablas de  $t = 2.776$ .

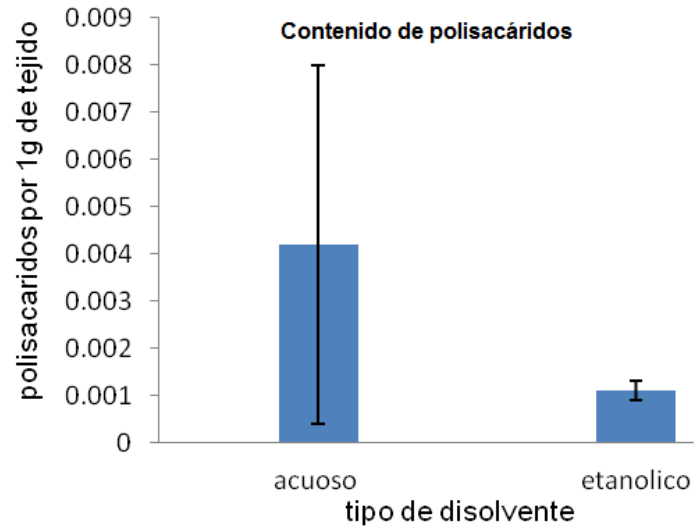


Figura 3: Cuantificación de polisacáridos en las muestras acuosa y etanólica. Las barras representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de la cantidad de polisacáridos, estableciendo la variación en el proceso de extracción.

Con relación a los datos de Cui *et al.*, (2003), podemos establecer que es favorable producir micelio en PD para realizar extracciones y, posteriormente, cuantificar polisacáridos; sin embargo, considerando que la técnica de DuBois que cuantifica carbohidratos simples, oligosacáridos, polisacáridos y derivados, incluyendo éteres de metilo, es posible que los polisacáridos de ambos extractos estén asociados a diferentes grupos de moléculas, como lo establecieron Cui *et al.*, (2003), en un extracto acuoso de *Colorius versicolor* y Zhang *et al.*, (2003), en el extracto acuoso del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum*, donde ambos casos reportaron la extracción de un péptido-glucano y en este caso Zhang *et al.*, establecieron una mayor proporción de polisacáridos que de péptidos.

## CONCLUSIONES

Para la obtención de cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum*, debe ajustarse mas la condición de humedad, considerando lo informado en la literatura para otros Basidiomicetos.

La producción de micelio en el medio líquido PD es variada en cada cultivo, y la producción de materia es escasa, lo que permite establecer que debe optimizarse el medio de cultivo para tener una mayor biomasa.

Con respecto a las extracciones, es más eficiente el rendimiento del cuerpo fructífero que del micelio. Sin embargo, el micelio por ser una fase temprana de desarrollo se puede obtener más fácilmente y por ende realizar extracciones.

La cantidad de polisacáridos de los extractos, acuoso y etanolico presentaron variaciones y el extracto acuoso presento la mayor cantidad de polisacáridos.

Debe realizarse un estudio más detallado del procedimiento de extracción con etanol al 50% en cuestión de tiempos de incubación u otras condiciones, ya que los trabajos previos manejan otras condiciones.

## REFERENCIAS

- Brizuela A. M., García L., Pérez L. & Mansur M., (1998), Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios, *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 69-74.
- Bruneton J., (1999), *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*, Editorial Acriba, 1ª edición, España, pp 1.
- Cárdenas G., (2009), *Kalanchoe spp.: una fuente natural de nuevas sustancias bioactivas puestas de manifiesto por la etnomedicina*, *Encuentros en la Biología*, 2: 124.
- Conrado S. V., López M. C., Vázquez V. E. & Álvarez I., (2002), Cultivation of *Ganoderma lucidum* and its effect on the production of lymphocytes. En, *Mushroom Biology & Mushroom Products. Mushroom Biology and Mushroom Products*, ISBN 968-878-105-3 381-383.
- Cui J., & Chisti Y, (2003), Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*, physiological activity, uses, and production, *Science*, 21:109-122.
- De Uña J. V., (2006), *Hongos Medicinales*, *Revista Micológica* 30-33.
- DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., & Smith F., (2002), Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-356.
- Duran D. A., Cisneros C. A. & Vargas V. A., (2006), *Bioestadística*, segunda edición, editorial FES-Iztacala, México Edo. de Mex, pp.-70-74, 121-131.
- Estrada M. E., Guzmán G., Cibrán T. D. & Ortega P. R., (2009), Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada (México), *Interciencia*, 34: 25-33.

- Fang Qing-Hua, Tang Ya-Jie & Zhong Jian-Jiang, (2002), Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*, *Science*, 37 (12): 1375-1379.
- Gaitán H., R., Salmones D., Pérez M., R. & Mata G., (2006) Manual del cultivo de setas (aislamiento, siembra y producción), Instituto de Ecología A.C., 1ª edición, Xalapa, Veracruz, México.
- García P. C., Kim B. N., Bich T. N., Tillan C. J., Romero D. J., Darío L. O. & Fuste M. V., (2009), Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia*, *Revista Cubana*, 14(2): 142.
- Garza O. L., Ramírez G. X., Garza O. F., Salinas C. M., Waksman N., Alcaraz C., Y. & Torres A. O., (2006), Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México, *Ciencia UANL*, 2:164-170.
- Hongbo Hu, Nam-Shik Ahn, Xinlin Yang, Yong-Soon Lee & Kyung-Sun Kang, (2002), *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycles arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell, *International Journal of Cancer*, 102: 250 –253.
- Lenis V., L., Benítez R., Peña S. E. & Chito T., D., (2007), Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Botrychya calliptera*, Colombia, *Scientia et Technica*, 33: 97-102.
- Lin Zhi-bin & Zhang Hui-na, (2004) Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms, *Acta Pharmacol Sinica*, 25(11) 1387-1395.
- Lu Qing-Yi, Jin Yu-Sheng, Zhang Qifeng, Zhang Zuofeng, Heber David, Go Vay Liang W., Li Frederick P. & Rao Jian Yu, (2004), *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro, *Cancer Letters* 216: 9–20.



- Martínez C. D., Morales P., Sobal M., Bonilla M. & Martínez W., (2007) México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles, Capítulo 6.1 En: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp.* Editorial ECOSUR-CONACYT, México Puebla, 1-20.
- Martínez, D., A., Larqué, M., Aliphat, A., Aguilar, M., Bonilla & W. Martínez, (2000), La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México, II Foro nacional sobre seguridad y soberanía alimentaria, Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT, México, D. F. pp. 193-207.
- Millán N. R., (2005), Producción de *Ganoderma lucidum*, España, Oficina Española de Patentes y Marcas, patente número 2 229 926, pp.-1-10
- Miyazaki T. & Nishijima M., (1981), Studies of fungal polysaccharides. XXVII structural examination of water-soluble, antitumor polysaccharides of *Ganoderma lucidum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (12): 3611-3616.
- Morrison T. & Boyd N., (1990), Química Orgánica, 5ª edición, E U.A, pp.220-243.
- Muñoz F., (2002), Plantas medicinales y aromáticas- Estudio cultivo y procesado, España, 1ª edición. Editorial Mundi Prensa, 15-17.
- Ortiz O. N., (2011) Estandarización del cultivo artificial de *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilát en sustratos lignocelulosicos suplementados, Edo de México, UNAM FES-Iztacala, Tesis de licenciatura, pp.- 1-55.
- Pérez G. J., (2006), Arguments in favor of incorporating  $\beta$ -D-glucans in food, España, journal *Endocrinología y nutrición*, 54:315-324.
- Pontón J., (2008), The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin, *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2): 78-82.

- Qing-Yi Lu, Yu-Sheng Jin, Qifeng Zhang, Zuofeng Zhang, David Heber, Vay Liang W. Go, Frederick P. Li & Jian Yu Rao, (2003), *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro, *Cancer letters* 216: 9-20.
- Ruiz S. D., Tay Z. J., Sánchez V. Trinidad. & Martínez G. H., (1999), Los micetos y su relevancia en medicina, *Revista Iberoamericana Micología*, 16: 121-125.
- Sheng-Yuan Wang, Ming-Ling Hsu, Hui-Chi Hsu, Cheng-Hwai Tzeng, Shih-Sheng Lee, Ming-Shi Shiao & Chi-Kuan Ho, (1997), The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and lymphocytes, *International Journal of Cancer*, 70: 699–705.
- Turlo J., Gutkowska B., Herold F., Dawidowski M., Słowinski T. & Zobel A., (2010), Relationship Between Selenium Accumulation and Mycelial Cell Composition in *Lentinula edodes* (Berk.) Cultures, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 73: 1211–1219.
- Wan J., Sit W, Yang X, Jiang P. & Wong L, (2010) Polysaccharopeptides derived from *Coriolus versicolor* potentiate the S-phase specific cytotoxicity of Camptothecin (CPT) on human leukemia HL-60 cells, *Chinese medicine*, 5:16.
- Wasser S., P., (2002), Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, *Applied Microbiology Biotechnology*, 60:258–274.
- Xie J.T., Wang C.Z., Wicks S., Yin J.J., Kong J., Li J., Li Y.C. & Yuan C.S., (2006), *Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer Cells, *Experimental Oncology*, 28: 25–29.
- Zhang Hui-Na & Lin Zhi-bin, (2004), Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides, *Acta Pharmacology Sinica*, 25 (2): 191-195.

Zhang Hui-Na, He Jing-Hua, Yuan L. & Lin Zhi-Bin, (2003), In vitro and in vivo protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage,-Life Sciences 73: 2307–2319.

Zhou X., Jiang H.,Lin J. & Tang K., (2007), Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extracts on human liver cancer and breast cancer cell line, African Journal of Biotechnology, 6 (15): 1740-1743.

## ANEXOS

### Anexo 1. Determinación de carbohidratos, Método de DoBois (fenol-ácido sulfúrico) (modificación de técnica).

Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O): 95%	Fenol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O): 5%	Acido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ): concentrado	Sosa (NaOH): solución 1M	Dextran
23.68ml de H <sub>2</sub> O + 26.32 ml de etanol	5g de fenol + 100 ml de H <sub>2</sub> O	100ml	4g de sosa +100 ml de H <sub>2</sub> O	<p><b>Solución madre:</b> 100mg de Dextran/10 ml de sosa al 1M</p> <p><b>Solución de trabajo:</b> 1ml de la solución madre + 79 ml de sosa al 1M</p>

Cuadro 10: Preparación de reactivos para la determinación de polisacáridos.

#### 🔧 Preparación de la muestra

- Centrifugar la muestra a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para eliminar los sólidos excedentes.
- Adiciona etanol para precipitar los polisacáridos.
  - ✓ **Muestra acuosa**
    - ❖ A 1ml de la muestra se le adiciona 4 ml de etanol (4:1)
  - ✓ **Muestra de etanol 50%**
    - ❖ A 1 ml de la muestra se le adiciona 1 ml de etanol al 95% (1:1)
- En ambos casos las muestras se centrifugan a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- El material resultante se suspende en solución 1M de NaOH:
  - ❖ **Agregar entre 1ml y 3 ml de la solución 1M de NaOH a la muestra acuosa.**
  - ❖ **Agregar 7ml de la solución 1M de NaOH a la muestra de etanol 50%.**

## Curva patrón

Tubo	Dextran Concentración (mg)	Dextran ( $\mu$ l)	solvente NaOH ( $\mu$ l)	Fenol ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Absorbancia (490 nm)
1	0	0	200	200	1	
2	5	40	160	200	1	
3	10	80	120	200	1	
4	15	120	80	200	1	
5	20	160	40	200	1	
6	25	200	0	200	1	
	<b>Concentración de la muestra (mg)</b>	<b>Muestra (<math>\mu</math>l)</b>				
7		100	100	200	1	
8		150	50	200	1	
9		200	0	200	1	
<b>Regresión lineal:</b>						
$Y = \beta_0 + \beta_1 X$						

Cuadro 11. Elaboración de curva patrón para la cuantificación de polisacáridos en las muestras.

## Anexo 2. Cálculo de cantidad de polisacáridos en las muestras.

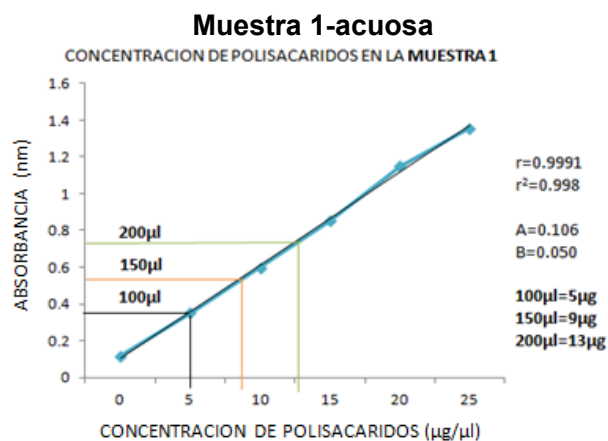


Figura 4: Curva patrón para la determinación de polisacáridos en la muestra 1.

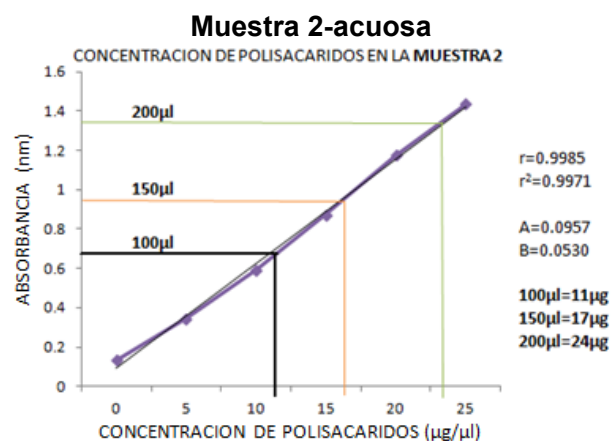


Figura 5: Curva patrón para la determinación de polisacáridos en la muestra 2.

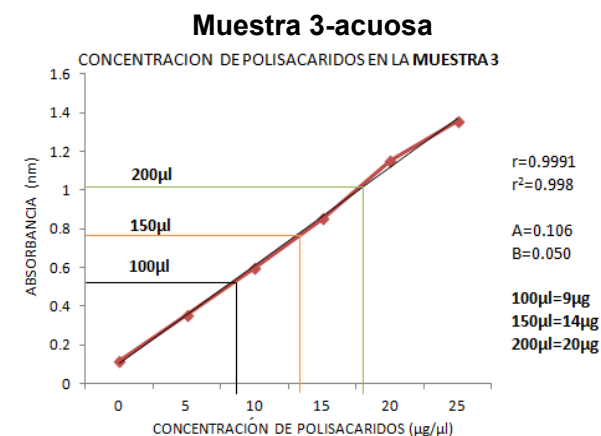


Figura 6: Curva patrón para la determinación de polisacáridos en la muestra 3.

Volumen de la alícuota (proporción de la alícuota)	Cantidad de polisacáridos (4g/100ml)
100µl (1:10)	0.005g
150µl (1.5:6.6)	0.005940g
200µl (2:5)	0.0065g
Promedio	0.00581g
Cantidad de polisacáridos (1g/25ml)	0.00145g

Cuadro 12: Cantidad de polisacáridos totales en la muestra 1-acuosa.

Volumen de la alícuota (proporción de la alícuota)	Cantidad de polisacáridos (4g/100ml)
100µl (1:30)	0.033000g
150µl (1.5:20)	0.034000g
200µl (2:15)	0.036000g
Promedio	0.034333g
Cantidad de polisacáridos (1g/25ml)	0.00860g

Cuadro 13: Cantidad de polisacáridos totales en la muestra 2-acuosa.

Volumen de la alícuota (proporción de la alícuota)	Cantidad de polisacáridos (4g/100ml)
100µl (1:10)	0.009g
150µl (1.5:6.6)	0.009240g
200µl (2:5)	0.01g
Promedio	0.00941g
Cantidad de polisacáridos (1g/25ml)	0.00235g

Cuadro 14: Cantidad de polisacáridos totales en la muestra 3-acuosa.

### Muestra 1-etanol al 50%

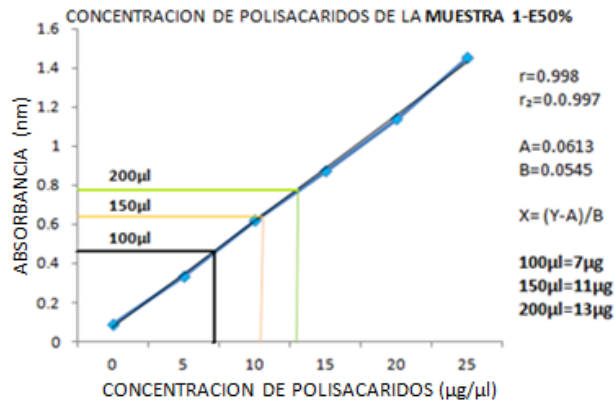


Figura 7: Curva patrón para la determinación de polisacáridos en la muestra 1.

### Muestra 2-etanol al 50%

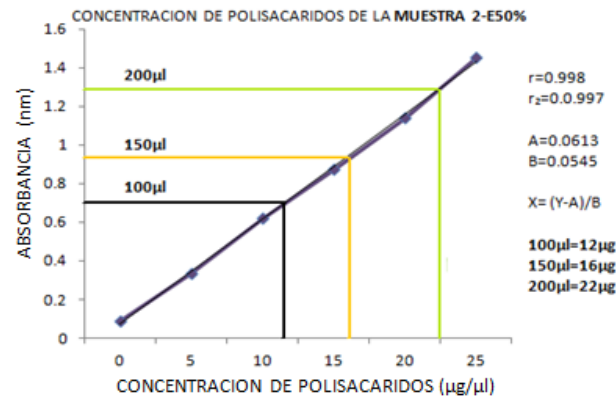


Figura 8: Curva patrón para la determinación de polisacáridos en la muestra 2

### Muestra 3-etanol al 50%

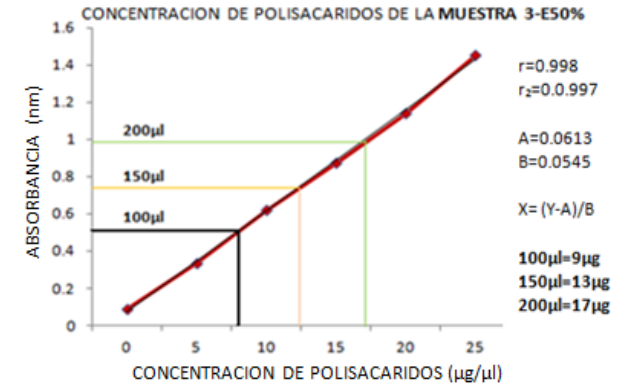


Figura 9: Curva patrón para la determinación de polisacáridos en la muestra 3.

Volumen de la alícuota (proporción de la alícuota)	Cantidad de polisacáridos (2g/20ml)
100µl (1:70)	0.003430g
150µl (1.5:46.6)	0.0035882g
200µl (2:35)	0.003185g
Promedio	0.0034010g
Cantidad de polisacáridos (1g/10ml)	0.0011336g

Cuadro 15: Cantidad de polisacáridos totales en la muestra 1.

Volumen de la alícuota (proporción de la alícuota)	Cantidad de polisacáridos (2g/20ml)
100µl (1:30)	0.033000g
150µl (1.5:20)	0.034000g
200µl (2:15)	0.036000g
Promedio	0.034333g
Cantidad de polisacáridos (1g/25ml)	0.0860g

Tabla 16: Cantidad de polisacáridos totales en la muestra 2

Volumen de la alícuota (proporción de la alícuota)	Cantidad de polisacáridos (2g/20ml)
100µl (1:10)	0.009g
150µl (1.5:6.6)	0.009240g
200µl (2:5)	0.01g
Promedio	0.00941g
Cantidad de polisacáridos (1g/25ml)	0.00235g

Tabla 17: Cantidad de polisacáridos totales en la muestra 3.