



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## **CAMPUS PUEBLA**

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXTRACTO  
ESTANDARIZADO DEL HONGO MEDICINAL *Ganoderma lucidum* Y  
ANÁLISIS DE SU IMPACTO POTENCIAL EN LA SALUD HUMANA**

**MA. DOLORES CASTAÑEDA ANTONIO**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2019



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados la que suscribe **Ma. Dolores Castañeda Antonio**, alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académica, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **“Caracterización fisicoquímica del extracto estandarizado del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y análisis de su impacto potencial en la salud humana”** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados al nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, el Consejero y la que suscribe, de acuerdo con las negociaciones entre las partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla a 01 de marzo de 2019

M.C. Ma. Dolores Castañeda Antonio

Vo. Bo. Profesor Consejero  
Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

La presente tesis, titulada: **Caracterización fisicoquímica del extracto estandarizado del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y análisis de su impacto potencial en la salud humana**, realizada por la alumna: **Ma. Dolores Castañeda Antonio**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

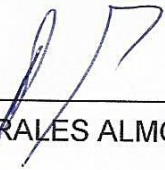
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESORA:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR:



DR. HERMILO LEAL LARA

Puebla, Puebla, México, 01 de marzo del 2019

## **Caracterización fisicoquímica del extracto estandarizado del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y análisis de su impacto potencial en la salud humana**

Ma. Dolores Castañeda Antonio, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2019

Existe en México una gran problemática en la salud de su población, sufre de diabetes, hipertensión, entre otras. Carece de infraestructura eficiente, debido al bajo presupuesto asignado, por lo que se deben generar propuestas de tratamientos alternos, con soportes confiables y alimentos funcionales, medicinales y probióticos. Sus alternativas las pueden brindar los hongos, especialmente *G. lucidum*, un hongo que crece de manera silvestre en nuestro país y ampliamente a nivel mundial. Se sabe que el ácido acetilsalicílico (AAS) es un eficiente precursor de incremento de metabolismos en plantas, en este trabajo se propuso adicionar el AAS (10 mM) durante su cultivo para incrementar las propiedades funcionales del hongo *G. lucidum* de los cuerpos fructíferos se obtuvieron extractos hidroalcohólicos que se caracterizaron, comparando cultivo tradicional (control) y cultivo adicionado (AAS). Se determinó la densidad obteniendo  $1.256 \pm 0.25$  y  $1.568 \pm 0.11$  g/cm<sup>3</sup>, azúcares reductores  $8.78 \pm 2.019$  y  $41.326 \pm 1.43$  %, índice de refracción  $1.323 \pm 0.0021$  y  $1.370 \pm 0.0015$  en el extracto control, y el adicionado, respectivamente. Se cuantificó la presencia de AAS por HPLC obteniendo de  $8.828 \pm 2.13$  µg/mL del extracto adicionado, por RMN se obtuvieron perfiles de presencia de glucopiranosidos, manosa y galactosa, se uso una técnica novedosa en el área Resonancia Magnética Radio Iónica, detectando aminoácidos como: alanina, arginina, cistina, glicina, lisina, prolina, serina y triptófano. Se notó mayor presencia de glicina en proporción 4:1 en extracto adicionado, ácidos orgánicos: propiónico, málico, ascórbico, fólico, láctico y salicílico. La mayor presencia de ácido ascórbico en proporción 3.5:1 mayor en el extracto adicionado. La técnica que brindó más información de la composición de los extractos fue por CG-EM debido a la identificación de los compuestos obtenidos por librerías NIST. Se detectaron β-glucopiranosidos, polisacáridos y polialcoholes como sorbitol, xilitol, ribitol, allo-inositol presentes en los extractos como precursores de polisacáridos y fracciones de la descomposición de los ácidos ganodéricos. Los resultados demostraron una diferencia significativa en el contenido de polisacáridos, ácidos y aminoácidos presentes en el extracto adicionado. La detección de estos compuestos reportados como responsables de las propiedades funcionales y anticancerígenas de este hongo, nos permite confirmar que el AAS incrementa el potencial de estas propiedades, aunque en menor cantidad como el topotecan y el alfa-dimetil-benzen etanoamino anticancerígenos y antitumoral, hidroxil[(1-oxo-2-propenil) amino]- ácido acético, eficientes contra la diabetes y la obesidad.

**Palabras clave:** Cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, enriquecimiento, espectrofotometría de masas, resonancia magnética.

# Physicochemical characterization of the standardized extract of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and analysis of its potential impact on human health

Ma. Dolores Castañeda Antonio, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2019

In Mexico there is a health problem in its population, suffering diseases such as diabetes, hypertension, among others. The lack of an efficient infrastructure, due to the low budget allocated, alternative treatment proposals must be generated, with reliable support and functional, medicinal and probiotic foods. These alternatives can be provided by fungi, especially *G. lucidum*, a mushroom that grows spreadly worldwide. It is known that acetylsalicylic acid (ASA) is an efficient precursor on increasing of metabolism in plants, in this work proposed to add the AAS (10 mM) during its cultivation to increase the functional properties of the fungus *G. lucidum* of the fruiting bodies, hydro-alcoholic extracts were obtained and characterized, comparing traditional culture (control) and added culture (AAS). The density was determined obtaining  $1.256 \pm 0.25$  and  $1.568 \pm 0.11$  g / cm<sup>3</sup>, reducing sugars  $8.78 \pm 2.019$  and  $41.326 \pm 1.43\%$ , refractive index  $1.323 \pm 0.0021$  and  $1.370 \pm 0.0015$  in the control extract, and the additive, respectively. The presence of AAS was quantified by HPLC, obtaining  $8,828 \pm 2.13$  µg / mL of the added extract, by NMR profiles of presence of glucopyranosides, mannose and galactose were obtained, a novel technique was used in the area Radio Ionic Magnetic Resonance, detecting amino acids such as: alanine, arginine, cystine, glycine, lysine, proline, serine and tryptophan. A greater presence of glycine was observed in a 4:1 ratio in the added extract, organic acids: propionic, malic, ascorbic, folic, lactic and salicylic. The greater presence of ascorbic acid in a 3.5:1 ratio higher in the added extract. The technique that provided more information on the composition of the extracts was by GC-MS due to the identification of the compounds obtained by NIST libraries. β-glucopyranosides, polysaccharides and poly-alcohols were detected as sorbitol, xylitol, ribitol, allo- inositol present in the extracts as precursors of polysaccharides and fractions of the decomposition of the ganaderic acids. The results showed a significant difference in the content of polysaccharides, acids and amino acids present in the added extract. The detection of these compounds reported as responsible for the functional and anticancer properties of this fungus, allows us to confirm that ASA increases the potential of these properties, although in smaller quantities such as topotecan and anti-cancer and anti-tumor alpha-dimethyl-benzene ethanoamine, hydroxy [(1-oxo-2-propenyl) amino] -acetic acid, efficient against diabetes and obesity.

**Keywords:** Gas chromatography, liquid chromatography, enrichment, mass spectrophotometry, magnetic resonance.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo para realizar el proyecto de investigación.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, por abrirme las puertas y darme la atención en todo momento para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional particularmente al Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera por su apoyo de siempre incondicional y por creer en mí.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por la oportunidad otorgada para realizar los estudios para obtener el grado de Doctor en Ciencias, muy particularmente el área de Vicerrectoría de Docencia por su apoyo y consideración.

A los integrantes del Consejo Particular, integrado por el Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Dr. Porfirio Morales Almora, Dra. Mercedes Sobal Cruz, Dr. Antonio Macías López y Dr. Hermilo Leal Lara, quienes aportaron en la formación de mi proyecto de investigación, gracias por todos esos consejos, apoyos, observaciones, orientación y conocimiento, así como la planta Académica del Colegio quienes profesionalmente aportaron de su conocimiento durante mis estudios.

A mis amigos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, muy especialmente al D.C. Helios Escudero Uribe, quienes también me brindaron orientación, consejos y por todo el apoyo.

Finalmente, y no menos importante, al Profesor Jorge Rugerío Alvarado por ser un gran guía en el aprendizaje de Idioma Inglés, por las largas horas que convivimos, por ser confidente de muchos de los que pasamos por esa área, por su amistad y apoyo, sin su orientación no podría haber logrado vencer ese obstáculo.

CONTENIDO		Páginas
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
2.1	Sociedad y desarrollo biotecnológico de hongos.....	3
2.2	Biotecnología de hongos funcionales y medicinales.....	4
2.3	Generalidades de Hongos funcionales.....	5
2.4	Propiedades funcionales y medicinales de los hongos.....	9
III.	MARCO DE REFERENCIA.....	11
3.1	<i>Ganoderma</i> spp .....	11
3.2	<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst. y sus propiedades.....	11
3.3	Morfología y fisiología de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	12
3.4	<i>Ganoderma lucidum</i> y sus propiedades.....	13
3.5	Consumo de <i>G. lucidum</i> en México.....	16
3.6	Ácido acetilsalicílico como un señalizador de respuesta biológica .....	17
3.7	Efecto del ácido salicílico y derivados adicionados endógenamente .....	19
3.8	Efecto del ácido salicílico y derivados adicionados exógenamente.....	19
3.9	Desarrollo de fármacos derivados de compuestos naturales y de <i>G. lucidum</i> .....	20
3.10	Métodos de extracción de compuestos bioactivos y funcionales.....	22
3.10.1	Extracciones en frío.....	22
3.10.1.1	Maceración.....	23
3.10.1.2	Ultrasonido .....	24
3.10.1.3	Microondas.....	25
3.10.2	Extracciones en caliente .....	25
3.10.3	Extracción en fluidos supercríticos.....	26
3.10.4	Estudios realizados para caracterización química de <i>G. lucidum</i> .....	26
IV	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	31
V.	HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	33
5.1	Hipótesis .....	33
5.2	Objetivo General .....	33
5.2.1	Objetivos específicos .....	33
VI	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1	Diagrama general de la metodología.....	34
6.2	Obtención de basidiocarpos .....	35
6.3	Sustancias químicas y reactivos.....	36
6.4	Obtención de extractos hidroalcohólicos .....	36
6.5	Caracterización de los extractos.....	37

6.5.1	Determinación de la Densidad.....	37
6.5.2	Determinación del índice de refracción.....	38
6.5.3	Determinación y cuantificación del ácido acetilsalicílico en los extractos .....	39
6.5.3.1	Determinación de AAS .....	39
6.5.3.2	Cuantificación de AAS .....	39
6.5.4	Comparación del contenido en los extractos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	40
6.5.5	Determinación de polisacáridos por el método de Fehling.....	41
6.5.6	Identificación de compuestos orgánicos por Resonancia Magnética Radio Iónica (RM RI) .....	42
6.5.7	Determinación de compuestos por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM) .....	43
6.5.7.1	Preparación de la muestra con extracción con cloroformo ...	43
6.5.7.2	Extracción con trimetilclorosilano (TMCS) para polisacáridos y polialcoholes por CG-EM.....	44
6.5.7.3	Extracción con dimetilsulfóxido (DMSO) para detección por CG-EM.....	45
6.6	Análisis estadístico .....	46
VII	Resultados y Discusiones.....	47
7.1	Extractos obtenidos.....	47
7.2	Densidad de los extractos.....	47
7.3	Índice de refracción.....	48
7.4	Azúcares Reductores por el método de Fehling.....	49
7.5	Cuantificación de ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	51
7.6	Identificación de compuestos detectados por resonancia magnética radio- iónica (MARSIII) .....	55
7.7	Determinación de perfiles por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	60
7.8	Identificación de compuestos orgánicos por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM).....	64
7.8.1	Compuestos por extracción con cloroformo .....	64
7.8.2	Compuestos por derivatización con trimetilclorosilano (TMCS).....	66
7.8.3	Compuestos con derivatización de DMSO.....	77
7.8.4	Propuesta de afectación de AAS a <i>G. lucidum</i> .....	82
7.9	Análisis del potencial farmacológico del extracto estandarizado de <i>G. lucidum</i> y su impacto en la salud humana.....	83
7.9.1	Eficiencia de los polisacáridos de <i>G. lucidum</i> (GLPS) en la regulación del sistema inmune.....	86
7.9.2	Efecto de estudios clínicos en miopatías .....	86
7.9.3	Actividad como hipoglucemiante e hipolipemiante .....	86
VIII	Contrastación de Hipótesis .....	87
IX	CONCLUSIONES .....	88



X.	Estrategia para el aprovechamiento de las propiedades los recursos genéticos del <i>G. lucidum</i> .....	90
10.1	Alcance .....	94
10.2	Alcance a futuro .....	94
10.3.	Actores sociales .....	96
10.4	Certificado de Extracto de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	97
XI.	LITERATURA CITADA.....	99
11.1	Glosario.....	113

LISTA DE FIGURAS		Páginas
Figura 1.	Polisacáridos de <i>G. lucidum</i> . 1 <sup>a</sup> : $\beta$ -Glucano, 1b: $\beta$ -manosa (Yihuai <i>et al.</i> , 2004).....	6
Figura 2.	Triterpenoides tipo lanostano de <i>G. lucidum</i> .....	7
Figura 3.	Compuestos esteroideos presentes en <i>G. lucidum</i> 3a. Pregn-5-ene-3,20-dione 3b. Ganoderpurina (Chai <i>et al.</i> , 1997).....	8
Figura 4.	Nucleósidos y alcaloides presentes en <i>G. lucidum</i> de izquierda a derecha: Ganoin, Ganodin y $\gamma$ -Butirotetaina ...	8
Figura 5.	Vía de fragmentación de terpenos por HPLC-DAD-ESI-MS	29
Figura 6.	Diagrama general de metodología.....	34
Figura 7.	CP-145 <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) aislado por el personal del CREGEN-HCFM .....	35
Figura 8.	Cultivo de <i>G. lucidum</i> bajo condiciones controladas.....	36
Figura 9.	Obtención de extractos hidroalcohólico al 32% .....	37
Figura 10.	Determinación de densidad en los extractos control y adicionado con AAS por el método del picnómetro .....	38
Figura 11.	Refractómetro ABBE utilizado para determinación de índice de refracción de los extractos.....	39
Figura 12.	Diagrama de trabajo para la determinación de AAS por HPLC.....	40
Figura 13.	Espectrofotómetro de RMN usado en la comparación de perfiles de los extractos .....	41
Figura 14.	Reducción de azúcares por la técnica de Fehling.....	42
Figura 15.	Analizador de Resonancia magnética cuántica radio iónica	43
Figura 16.	Extracción líquido-líquido con cloroformo de los extractos de <i>G. lucidum</i> .....	44
Figura 17.	Diagrama general de derivatización de los extractos de <i>G. lucidum</i> con TCMS para polisacáridos y polialcoholes.....	45
Figura 18.	Diagrama general del proceso de extracción con derivatización DMSO para detección de ácidos orgánicos...	46
Figura 19.	Extractos obtenidos del hongo <i>G. lucidum</i> a la derecha el extracto adicionado (cultivo con AAS) y a la izquierda el extracto testigo (cultivo tradicional) .....	47
Figura 20.	Densidad de los extractos testigo y adicionado con AAS....	48
Figura 21.	Lecturas de índice de refracción, a la izquierda el resultado del extracto control a la derecha la lectura del extracto adicionado con AAS.....	49
Figura 22.	Determinación de azúcares reductores por la técnica de Fehling. La figura 20a es el reactivo inicial de Fehling, se mantiene en agitación y temperatura constante, la figura 20b se torna café rojizo por la adición del segundo reactivo se continua con la adición de la muestra que está en la	

	bureta y genera un precipitado rojo, 20c el punto de viere al adiconar la muestra.....	49
Figura 23.	Tiempo de retención del ácido acetilsalicílico por HPLC.....	51
Figura 24.	Curva de calibración de ácido acetilsalicílico.....	52
Figura 25.	Hidrolisis del ácido acetilsalicílico .....	53
Figura 26.	Presencia de ácido acetilsalicílico en la muestra cuyo sustrato estuvo adiconado con AAS determinado por HPLC. ....	54
Figura 27.	Estructura de una prostaglandina E1 (PGE1) .....	55
Figura 28.	Perfil de Aminoácidos encontrados por resonancia magnética radio-iónica .....	56
Figura 29.	Gráfico comparativo de ácidos orgánicos presente en los extractos .....	57
Figura 30.	Detección de compuestos orgánicos por resonancia magnética radio-iónica .....	58
Figura 31.	Comparación de los perfiles de muestras por RMN, figura 31a monitoreo de hidrógeno deuterado y figura 31b monitoreo de <sup>13</sup> C deuterado para ambos extractos medidos a 27°C.....	60
Figura 32.	Perfiles reportados por RMN por Roy et al., (2009) para glucósidos, 32a perfil de <sup>13</sup> C, 32b perfil reportado para <sup>1</sup> H.	61
Figura 33.	Perfil cromatográfico para la determinación de azúcares por CG-EM.....	66
Figura 34.	Azúcares y polialcoholes determinados por GC-EM en el extracto control y extracto de muestra adiconado AAS.....	67
Figura 35.	Perfiles iónicos de los sacáridos más abundantes de <i>G. lucidum</i> mexicano .....	69
Figura 36.	Perfiles iónicos de los polialcoholes más abundantes en el extracto de <i>G. lucidum</i> mexicano.....	70
Figura 37.	Vía metabólica de la glucosa a 3-metil-1-butanol, por <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , entre otras .....	71
Figura 38.	Perfiles iónicos de los polisacáridos presentes en ambos extractos de <i>G. lucidum</i> mexicano.....	73
Figure 39.	Estándar de ácido ganoderico analizado por CG-EM.....	74
Figura 40.	Comparación de estándar de ácido ganoderico por CG-EM con los extractos.....	75
Figura 41.	Comparación de compuestos detectados por CG-EM en extracto control y extracto adiconado con AAS .....	75
Figura 42.	Comparación de cromatogramas de extracto control y extracto adiconado con AAS, en la imagen de abajo se muestra la zona de mayor diferencia .....	77
Figura 43.	Perfil cromatográfico del extracto de <i>G. lucidum</i> con derivatización de DMSO .....	78
Figura 44.	Propuesta de afectación del AAS al metabolismo de <i>G. lucidum</i> .....	82
Figura 45.	Interacción de los GLPS y Terpenos con la salud.....	83

Figura 46.	Aseguramiento de productos milagro en Puebla por parte de COFEPRIS. Foto: Cofepris/galerías.....	92
Figura 47.	Diagrama de estrategia para el aprovechamiento de las propiedades los recursos genéticos del <i>G. lucidum</i> .....	93
Figura 48.	Posibles productos derivados de los extractos de <i>G. lucidum</i>	94
Figura 49.	Certificados de extractos de <i>G. lucidum</i> CP145 .....	97
Figura 50.	Proceso que se debe seguir para obtener el permiso de uso y trámites de registro COFEPRIS.....	98

LISTA DE TABLAS		Páginas
Tabla 1.	Ingredientes activos de <i>G. lucidum</i> .....	15
Tabla 2.	Medicamentos de <i>G. lucidum</i> autorizados por SFDA China	21
Tabla 3.	Valores obtenidos en el análisis de los extractos para azúcares reductores.....	50
Tabla 4.	Relación de enlaces y proporciones de H para RMN .....	62
Tabla 5.	Relación de enlaces y proporciones de C para RMN.....	63
Tabla 6.	Compuestos obtenidos por extracción con cloroformo CG-EM.....	65
Tabla 7.	Detección de los compuestos más abundantes por extracción con cloroformo por GC-EM .....	68
Tabla 8.	Compuestos detectados en sobrenadante de extracto en cloroformo.....	76
Tabla 9.	Compuestos encontrados con derivatización con DMSO...	79
Tabla 10.	Compuestos característicos tipo terpenoide o sus fracciones detectadas en ambos extractos por la derivatización con DMSO.....	80
Tabla 10a.	Compuestos característicos tipo terpenoide o sus fracciones detectadas en ambos extractos por la derivatización con DMSO.....	81
Tabla 11.	Funcionalidad de Compuestos en Extractos de <i>G. lucidum</i>	84
Tabla 12.	Matriz de Potencialidades y Beneficios.....	95

## I. INTRODUCCIÓN

La importancia de los cultivos de hongos comestibles y medicinales es mayor cada día en diversos países, aprovechando sus propiedades funcionales, antimicrobianas, medicinales que benefician a la salud humana y que generan apoyo económico y social, ya sea por el consumo de los hongos como alimentos o en forma de extractos donde se aprovechen sus metabolitos con aplicación de la biotecnología, dentro de los más importante mencionados en la cadena agroalimentaria emergentes por citar algunos shiitake (*Lentinula*), maitake (*Grifola*), setas (*Pleurotus*), pinatra (*Cyttaria*) y reishi o Lingzhi (*Ganoderma*) (De Buijn *et al.*, 2010; Mayett y Martínez, 2016).

Los hongos son considerados alimentos funcionales en particular hablando de *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) que presenta propiedades nutrimentales, debido a que contiene compuestos que influyen en forma positiva de uno o más procesos fisiológicos, permitiendo el incremento de la salud, disminuye el riesgo de contraer o desarrollar enfermedades como cáncer, afecciones cardiovasculares, adenocarcinoma gástrico, VIH, hipertensión y hepatitis, también presenta propiedades hipocolesterolemiantes y efectos prebióticos, estos últimos reportados en extractos estandarizados de cultivos adicionados con ácido acetilsalicílico a una concentración de 10 mM, probado en modelo animal por 43 días de dieta experimental (Meneses *et al.*, 2016).

Son grandes los beneficios aportados por el consumo de sus basidiocarpos, micelios y estructuras vegetativas que se reportan de los hongos, debido a que presentan una gran variedad de compuestos bioactivos cuyas técnicas de obtención son diversas de acuerdo con el tipo, tamaño, sabor y abundancia del hongo.

Los compuestos bioactivos son bastante complejos y comúnmente se ofrecen en el mercado en una amplia gama de prestaciones con propósito terapéutico y de prevención de enfermedades, las formas varían, desde suplementos dietéticos o extractos, capsula, polvos, tabletas, alimentos suplementados y bebidas adicionadas o deshidratadas (Martínez-Carrera *et al.*, 2014), siendo estos últimos dentro de los más populares para los consumidores, por esta razón la industria alimentaria lo

utilizan en diferentes presentaciones, como extracto de alcohol o agua, polvos, jarabes y licores, modificando tanto la presentación o contenido de sus compuestos.

El concepto de alimento funcional ha cambiado a la industria alimenticia y ésta a su vez a la investigación básica relacionada con esa área, lo que conduce a la posibilidad de modificar la composición de los productos alimenticios, reduciendo los compuestos no deseables e incrementando las sustancias bioactivas (Duggan *et al.*, 2002). El mercado de productos que se comercializan no siempre garantizan una adecuada calidad de los productos ofrecidos a los consumidores en forma directa o indirecta a través de medios de comunicación, debido a que el objetivo de la mercadotecnia es la explotación comercial de las propiedades de los alimentos funcionales, en este caso particularmente nos referimos a los hongos medicinales, descuidando la composición natural, la proporción de los compuestos y la purificación de los compuestos activos presente en los productos fúngicos que pudieran adquirirse, esto demerita la calidad de los productos ofrecidos y pone en riesgo la credibilidad de las propiedades, dando como consecuencia la tendencia a una disminución del consumo de productos naturales.

Se han realizado diversas investigaciones como soporte de las propiedades de hongos medicinales y comestibles algunas que demuestran sus propiedades y otras que enriquecen sus contenidos con bases científicas, como la obtención de mayor contenido de antioxidantes o incrementar propiedades antimicrobianas, funcionales y nutricionales, realizando pruebas en modelos tanto animales como humanos para combatir enfermedades crónicas degenerativas como diabetes *mellitus* tipo 2 y colesterolemia (Meneses *et al.*, 2016).

El objetivo de este estudio fue investigar la composición química en extractos hidroalcohólicos estandarizados del hongo *G. lucidum* mexicano al estimular la producción de sus compuestos funcionales y medicinales, mediante la adición de ácido acetilsalicílico (AAS) en su sustrato durante su cultivo bajo condiciones controladas, permitiendo que su valor funcional y propiedades bioactivas sean incrementadas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Sociedad y desarrollo biotecnológico de hongos

Los hongos comestibles en México tienen un desarrollo importante a partir de mediados del siglo XX permitiendo una mayor expansión en el siglo XXI. Con la entrada del país en el Tratado de libre Comercio de América del Norte (TLCAN) en enero de 1994 se contaba con grandes limitaciones en el cambio y limitación de las importaciones mexicanas de hongos comestibles y la instalación de empresas transnacionales en territorio nacional. No obstante, se han logrado establecer tratados comerciales importantes abarcando América del Norte, Unión europea, Japón, Centro América y Sudamérica (López-Martínez y Martínez-Carrera, 2010).

En el rubro de hongos comestibles se impulsa el cultivo de Champiñones (*Agaricus bisporus*), seguida de Setas (*Pleurotus* spp), Shiitake (*Lentinula edodes*), y Reishi (*Ganoderma lucidum* (curtis) P. Karst) así como sus productos funcionales incluyendo maitake (*Grifola frondosa* (Dicks)). Dentro de las especies más comerciales de *Agaricus* está el “portobello” que junto con las “setas” (*Pleurotus ostreatus*) se cuenta con un desarrollo importante en los estados de Puebla, México, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, Veracruz, Jalisco, Yucatán, Querétaro y Chiapas. Se desarrollan favorablemente debido a su sencillez de la tecnología de cultivo permitiendo una producción a pequeña y gran escala.

Los hongos comestibles son favorecidos por su sabor, valor nutricional y como alimentos promotores de salud, tradicionalmente estos se recolectan como un manjar aun cuando ya es muy común este alimento cultivado, son apreciados en todo el mundo por su aroma particular y su textura. Para especies como *reishi*, *shiitake* y *maitake* solo se impulsaron algunas pruebas a escala comercial debido a que son de características de cultivo más exigentes que los mencionados arriba (López-Martínez y Martínez-Carrera, 2010.).



## **2.2 Biotecnología de hongos funcionales y medicinales**

La demanda de hongos comestibles y medicinales se debe por sus propiedades funcionales y probióticos, estos hongos crecen principalmente en hábitats boscosos en suelos donde existen medios saludables, en zonas que han sido afectadas por incendios y donde existen mucha materia orgánica con humedad, es decir donde se encuentra una constante degradación de materia orgánica que proporcionan un ambiente favorable para producir eco tipos saprófitos que favorecen en forma, sabor y contenido de biocompuestos.

Importantes características de los hongos se ven afectadas por las perturbaciones antropogénicas, el cambiar el uso de suelo afecta las variedades silvestres y sus propiedades por lo que se considera un factor importante el realizar investigaciones que propongan sustratos alternativos y con ello permitir cubrir la demanda de estos hongos. En la naturaleza, la formación de cuerpos fructíferos está asociada con una amplia gama de condiciones de estrés ambiental, algunos de los cuales se tratan de replicar en sustratos bajo condiciones controladas (Masaphy, 2010).

El valor nutricional y sabor de algunos hongos comestibles han sido estudiados aun cuando para algunas especies el cultivo de estos hongos sea un proceso largo y complejo que implica el uso de compost sólido o lecho de lignocelulosa, tal como paja o algodón, seguido por un cultivo largo. Para algunas especies también se ha intentado el cultivo de micelio de hongos en medios líquido, este es un medio nutritivo definido siendo un método alternativo simple y rápido para producir biomasa fúngica pero no en todos los casos funciona (Barros *et al.*, 2013).

La producción de hongos por cultivo tradicional y la extracción de los metabolitos bioactivos en algunos casos son muy difíciles, la biotecnología es fundamental para el desarrollo de técnicas rentables y productivas para la obtención de metabolitos. El desarrollo de estas tecnologías en medios líquidos proporciona manejo de variables, lo que permite realizar cultivos de micelio de macro hongos con significativa reducción de tiempo y aumento en la producción de sus metabolitos con el objetivo se obtención y el estudio de compuestos con potencial como

medicamentos, nutraceuticos y cuasi farmaceuticos tanto del medio agotado como del micelio.

Se han realizado estudios que no solo se limitan a promuevan mayor conocimiento del aprovechamiento de las propiedades del *G. lucidum* sino de otros factores más limitado en la investigación, como uno de los trabajos recientes es para estudiar el efecto de su cultivo en diversos subproductos agrícolas, usando residuos de vaina de frijol y residuos de mazorca donde se reportó un rendimiento de 40.9-49.7% de eficiencia (Bernabé-González *et al.*, 2015).

### **2.3 Generalidades de hongos funcionales**

Los hongos son bajos en calorías, alto contenido de proteínas, elementos inorgánicos como el hierro entre otros minerales, fibras y vitaminas tales como la B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>. Dentro de otras propiedades se ha encontrado que pueden inhibir el crecimiento de tumores, puede disminuir la incidencia y tratamiento de cáncer de estómago, esófago, pulmones y de próstata. México en particular cuenta con una amplia diversidad de hongos comestibles, funcionales y medicinales debido a su gran variedad de climas y tipos de vegetación lo cual representa una riqueza biológica para estudios taxonómicos, ecológicos, sociales y económicos, así como en el área medicinal (Tello-Salgado, *et al.*, 2016)

Esto se ha logrado empleando diversos sistemas modelo *in vitro* e *in vivo*, así como también desarrollando medicamentos específicos.

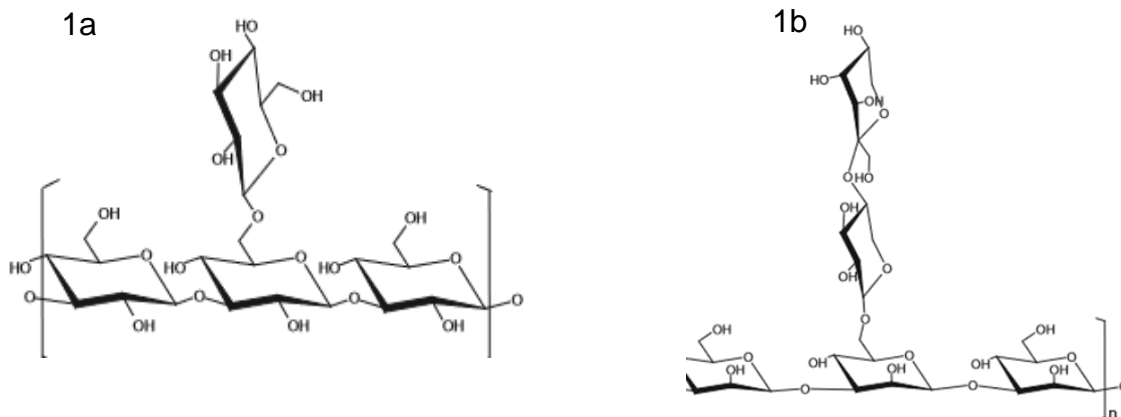
De las 15 000 especies de hongos en el mundo cerca de 700 se conocen sus propiedades medicinales, se estima que cerca de 1800 especies de hongos que tienen atributos medicinales potenciales que han sido investigado en las últimas décadas en sistemas modelo *in vitro* e *in vivo*, muchas sustancias bioactivas con efecto inmunomoduladores han sido aislado de los hongos. Dentro de los principales componentes encontrados son: polisacáridos de alto y bajo peso molecular, proteínas de bajo peso molecular ligadas a polisacáridos, glicoproteínas (lectinas), compuestos terpenoides y proteínas inmunomoduladoras fúngicas (Chang *et al.*, Miles, 2004).

Además, amplias gamas de pruebas indican que los hongos comestibles silvestres contienen muchos compuestos biológicamente activos con propiedades

antioxidante, antibacteriano, hepatoprotector, antirradical, anti-hiperglucémico, antiangiogénico e incluso antiinflamatorio, antitumoral, antialérgico, anti-aterogénico y hematológico propiedades (León-Guzmán *et al.*, 1997).

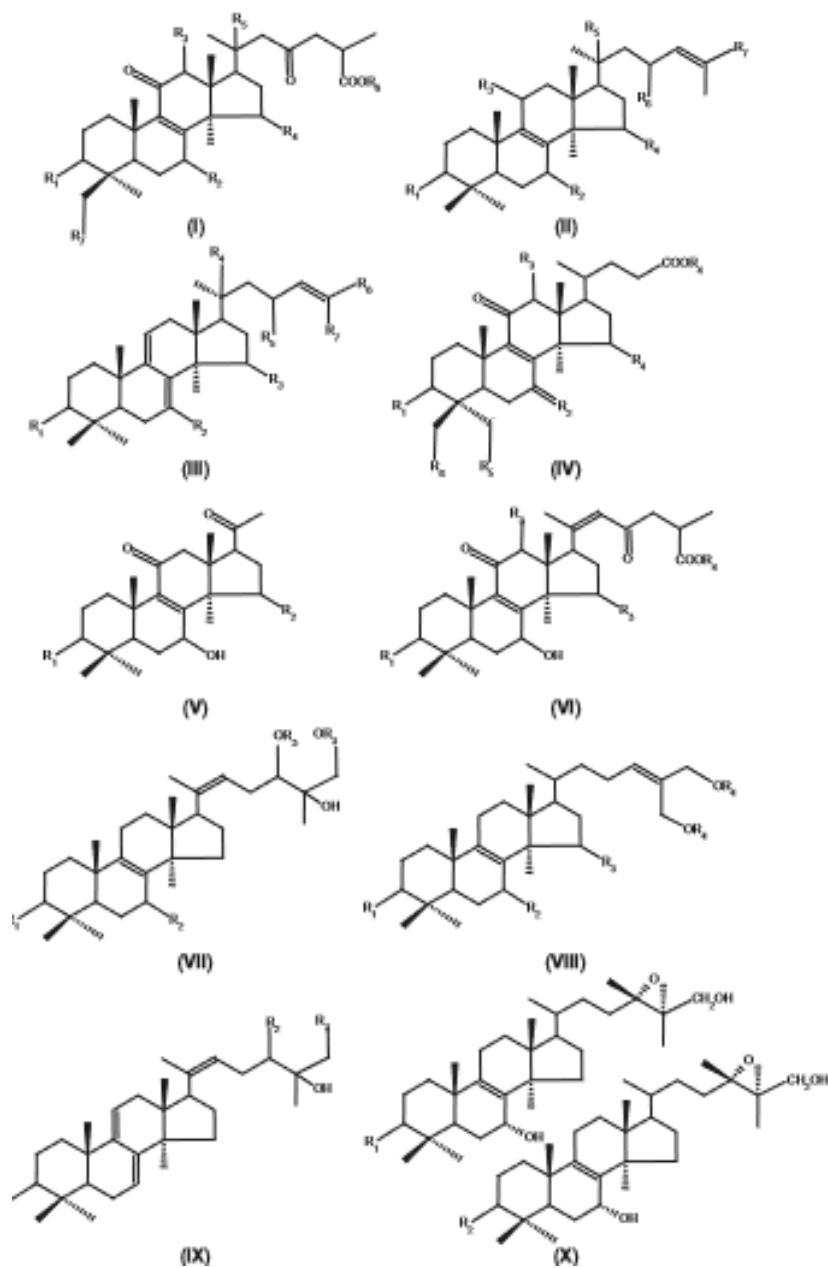
Aproximadamente 400 sustancias químicas se han aislado de *Ganoderma*, incluidos principalmente polisacáridos, triterpenoides, nucleósidos, ergosteroles, ácidos grasos, proteínas/péptidos y elementos traza. Varios polisacáridos como los  $\beta$ -D-glucanos,  $\alpha$ -D-manosa, heteropolisacáridos y glicoproteínas acompañados de compuestos terpenoides, son estudiados y representan los principales constituyentes de la actividad hepatoprotectora (Yihuai *et al.*, 2004).

Los  $\beta$ -D-glucanos consisten en un esqueleto lineal de grupos D-glucopiranosil con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) con distintos grados de ramificación desde la posición C6, mientras que los  $\alpha$ -D-manosa tienen un esqueleto de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-grupos D-manopiranosil unidos con un grado variable de ramificación desde la posición C2 o C6 (Miyazaki y Nishijima, 1981). Las ramas generalmente son un solo residuo de glucosa, aunque en algunos glucanos puede haber más de una unidad de glucosa.



**Figura 1.** Polisacáridos de *G. lucidum*. 1<sup>a</sup>:  $\beta$ -Glucano, 1b:  $\alpha$ -manosa (Yihuai *et al.*, 2004).

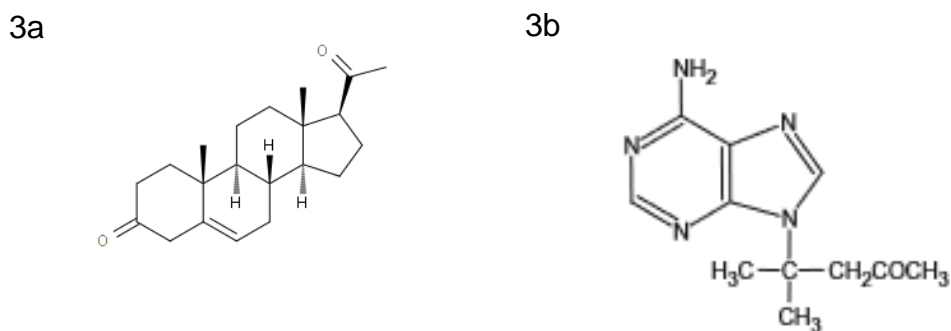
Los triterpenoides de *Ganoderma* son los ácidos ganodérico y lucidénico, los cuales contienen un esqueleto de lanostano y se clasifican en 10 grupos según su número de carbono y su estado de oxidación (Komoda *et al.*, 1985; Yihuai *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Triterpenoides tipo lanostano de *G. lucidum*. (Yihuai *et al.*, 2004).

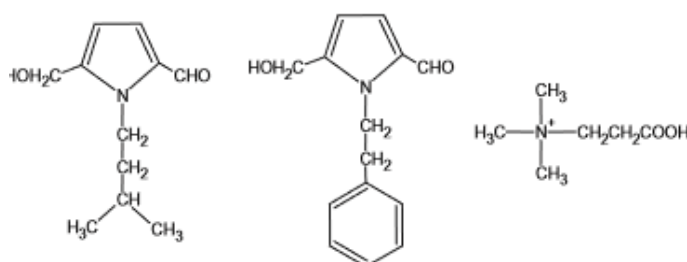
Estos triterpenoides se dividen en 10 grupos según la similitud estructural. Las moléculas en los grupos IV y V contienen 27 y 24 átomos de C, respectivamente, y todos los otros grupos tienen 30 átomos de C (Yihuai *et al.*, 2004). Muchos triterpenoides de *Ganoderma* han mostrado actividades biológicas como efectos antitumorales, inmunomoduladores, hepatoprotectores, antivirales y antioxidantes (Kim y Kim, 1999).

Otros compuestos comunes en *G. lucidum* son los esteroides, dentro de los que se encuentran el ergosterol (Erikson y Nes, 1982) contiene pequeñas cantidades de polifenoles, esteroides, lignina, ganomicinas, vitaminas, lectina, nucleósidos, nucleótidos, alcaloides, aminoácidos y germanio orgánico (Chai *et al.*, 1997; Rosecke y Konig, 2000).



**Figura 3.** Compuestos esteroides presentes en *G. lucidum* 3a. Pregn-5-ene-3,20-dione 3b. Ganoderpurina (Chai *et al.*, 1997).

Existen también compuestos nucleósidos y alcaloides dentro de la naturaleza de *G. lucidum* (Yihuai *et al.*, 2004).



**Figura 4.** Nucleosidos y alcaloides presentes en *G. lucidum* de izquierda a derecha: Ganoin, Ganodin y  $\gamma$ -Butirotetina.

## 2.4 Propiedades funcionales y medicinales de los hongos

Los hongos se han vuelto atractivos como alimentos y como fuente en el desarrollo de drogas y nutraceuticos. Se ha definido un hongo como nutraceutico cuando consideramos su biomasa seca o el extracto refinado total o parcialmente del micelio y/o el cuerpo fructifero consumido en forma de capsulas, tabletas, no como comida sino como complemento alimenticio, con posible ampliación terapeutica o preventiva.

El micelio suele utilizarse como alimento y material aromatizante de alimentos, o en la formulación de productos nutraceuticos y alimentos funcionales. Por definición un hongo funcional es un producto con la capacidad de regular y optimizar la respuesta inmunológica en el humano, permitiendo presentar resistencia a las enfermedades y en ocasiones causar una regresión en el estado patológico. Sin embargo, también puede cubrir la definición de nutraceutico y esto es cuando el origen del complemento es elaborado a partir de una fuente no considerado tradicionalmente comestible, siendo este el caso de *Ganoderma* (Trigos y Suárez-Medellín 2010).

El cultivo de *G. lucidum* es una industria multimillonaria en la que Lingzhi como también se le conoce es cultivado o recogido de la naturaleza y consumido como un té, en bebidas alcoholicas, y como nutraceuticos para conferir numerosos beneficios para la salud. El consumo de nutraceuticos ha crecido en popularidad y cada vez es más importante identificar los ingredientes activos y los proveedores hacen afirmaciones de salud fundamentadas sobre sus productos.

Dentro de las actividades farmacológicas atribuidas a los triterpenos y esteroides que son derivados de lanostanoides con un alto grado de oxidación. Estos compuestos, denominados genéricamente alcoholes y ácidos ganodericos, presentes en *G. lucidum* y otras especies, se les atribuye las propiedades anticancerosas, mientras que la actividad inmunomoduladora ha sido asociada a su contenido en polisacáridos (Ríos-Cañavate, 2008).

Los efectos demostrados experimentalmente para los triterpenos de *G. lucidum* se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a) Inhibición del crecimiento de células humanas de hepatoma;
- b) Propiedades antioxidantes de ácidos ganodéricos A, B, C y D, ácido lucidénico B y ganodermanotriol frente a oxidación inducida por pirogalol en membranas de eritrocitos y peroxidación lipídica en microsoma hepático-inducida por Fe(II)-ascorbato;
- c) Inhibición la actividad proteasa HIV-1, demostrada para ácido ganodérico, lucidumol B, ganodermanodiol, ganodermanotriol y ácido ganolucídico (Ríos-Cañavate, 2016).

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 *Ganoderma spp*

Dentro de la gran variedad de hongos comestibles y medicinales, existen los basidiomicetos que han sido usado en diversas regiones de Asia, conocido científicamente como *Ganoderma sp* es un género de hongos poliporo que crecen en la madera que incluyen alrededor de 80 especies. Los basidiomicetes poseen un gran potencial para la producción de enzimas de amplia aplicación en la industria farmacéutica, alimentaria y en la recuperación de aguas y suelos.

El número de especies conocidas de *Ganoderma* se puede estimar en alrededor de 60-80 especies lacadas y 10-30 especies no lacadas, es probable que los nuevos taxones están aún por descubrirse en las regiones tropicales no muy estudiadas (Moncalvo y Ryvarden, 2001). Este género en particular ha sido ampliamente estudiado debido a que algunas de sus especies poseen propiedades medicinales y gran potencial ligninolítico, también se han encontrado efectos terapéuticos acompañados de una alta capacidad antioxidante en los géneros *Ganoderma tsugae* and *Ganoderma lucidum*, este último es de los más importantes, se han encontrado cualidades medicinales, se refiere que dentro de sus propiedades cuenta con compuestos farmacológicos con actividad inmunológicas muy importantes (Wei *et al.*, 2012; Echavarría y Mejía, 2010).

#### 3.2 *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y sus propiedades

***Ganoderma lucidum*** ubicación taxonómica (Chang y Miles, 2004).

Reino: Fungi

División: Basidiomycotina

Clase: Hymenomycetes

Orden: Aphyllophorales

Familia: Ganodermataceace

Género: *Ganoderma*

Especie: *G. lucidum*



*Ganoderma lucidum* es también conocido como Reishi en Japón o Lingzhi en China, es un hongo basidiomiceto, y también es probablemente el género morfológicamente más complejo de la familia Polyporaceae, es una especie cuya importancia radica en su actividad biológica y uso en la medicina, contiene terpenos, triterpenoides tipo lanostanos, ganoderatos, ácido ganodéricos, lucidumol, lucidiadiol entre otros y que tienen potencial para el tratamiento del cáncer (Zhou *et al.*, 2012).

### **3.3 Morfología y fisiología de *Ganoderma lucidum***

Durante las últimas décadas, se ha demostrado que la morfología y las características del cultivo de las especies del mismo género pueden ser afectadas por las condiciones de crecimiento, esto hace una gran variedad de números de especies debido a que se han identificado apoyándose en sus características morfo-descriptivas, las formas del basidiocarpo, el color y la forma de las basidiósporas es afectada por las condiciones ambientales, altitud y latitud donde se desarrollan (Tello-Salgado *et al*, 2010). Se caracteriza por tener basidiomas bi o perianuales, pileados, sésiles o estipitados central o lateralmente con la superficie del basidiocarpo lisa, opaca o brillante con cutícula distintiva de color café claro a púrpura oscuro. Sus hifas di o trimítico, por lo regular no presentan cistidos, sus basidiósporas son 7-25 µm de longitud van desde amarillas a color café (Quiroz-Cerezo, 2012).

Los parámetros de crecimiento y la obtención de cuerpos fructíferos los resume Miles y Chang (2004):

1. Temperatura: La temperatura para el crecimiento micelial oscila de 15 a 35 °C y la temperatura óptima es de 24 a 25 °C. Para la iniciación de primordios oscila de 18 a 25 °C; y para el desarrollo de cuerpo fructífero es de 20 a 25 °C.
2. Contenido de agua en el substrato: Se mantiene entre 60% a 65%.
3. Humedad relativa: El micelio requiere del 60% a 70% de humedad; la iniciación de primordios de un 85% a 90% y el desarrollo de fructificación entre 70% a 85%.
4. Ventilación: Durante el período de fructificación, la buena ventilación es necesaria.
5. pH: El óptimo es de 5,0 a 5,5.
6. Luz: Durante la iniciación de primordios, se requiere luz de aproximadamente 500 a 1000 lux; y para el desarrollo del cuerpo fructífero 750-1500 lux.

Las condiciones de nutrición para su crecimiento incluyen fuentes de carbono como celulosa, hemicelulosas y lignina, nitrógeno, sales inorgánicas y factores de crecimiento. El aserrín de árboles de hoja ancha y subproductos agrícolas, como la cáscara de la semilla de algodón, paja, rastrojo de maíz, salvado de trigo, polvo de maíz, polvos gruesos de salvado de arroz, sulfato de amonio, urea, etc., se emplean en el cultivo de los cuerpos fructíferos (Rendon Hernández, 2015).

El estudio de la función de los componentes que contienen este hongo, se ha incrementado siendo de las más destacadas, su función antibacteriana, anticancerígeno asociado a los triterpenos y polisacáridos por los mecanismos de inhibición de la polimerasa de ADN, post-inhibición, modificación y traducción de la oncoproteína y proteínas inmunomoduladoras fúngicas (FIPS) o la estimulación en la producción de citoquinas (Wei *et al.*, 2012), anticandida, anti colinesterasa, anti-complemento, antileishmania, anti-inflamatorio, anti-invasivo, animalario, antioxidante, antituberculosos, antitumoral, antiviral, y las actividades citotóxicas de terpenoides de origen de setas.

La taxonomía del género *G. lucidum* aún está en estudio, el análisis de las secuencias de la región ITS-ADN sin embargo se han identificado tres linajes de *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. *sensu lato* en México (Morales *et al.*, 2010).

### **3.4 *Ganoderma lucidum* y sus propiedades**

Se ha reportado que el hongo Reishi como también es conocido, contiene más de 40%  $\beta$ -D-glucano, esto permite que pueda activar tanto las células T y esplénica macrófagos.  $\beta$ -D-glucano es el principal ingrediente de los GLPS. En un estudio realizado por Wang *et al.*, (1997), demuestran que los polisacáridos extraídos de los cuerpos fructíferos de *G. lucidum* pueden estimular la producción de los IL-1 $\beta$  de, IL-6, TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN y en macrófagos humanos y T-linfocitos.

Estos resultados han sido comprobados y confirman que los polisacáridos obtenidos podrían aumentar la actividad inmune celular *in vitro*, así como *in vivo*, mediante la modulación de citoquinas. Chen Hao-Yeh *et al.*, (2010) demostraron que el complejo de leucinas (LZ-8) podría activar macrófagos murinos y linfocitos T, siendo los polisacáridos meramente los activadores para los macrófagos, lo que sugiere sus diversas funciones en la activación de la inmunidad innata y adaptativa.

Probablemente, el efecto inmunomodulador de la biomasa de *G. lucidum* es mediada por células T, la inmunidad puede explicarse por el efecto sinérgico de todas estas sustancias biológicamente activas, que podrían ser también situadas en la biomasa, ya que no siempre es la acción inmunomoduladora de una forma pura o del complejo polisacárido u otra sustancia. Sin embargo, la presencia de compuestos bioactivos depende principalmente de la cepa, origen, procesos de extracción y condiciones de cultivo.

En estudios donde se ha aplicado polisacáridos de *G. lucidum* en ratas Wistar diabéticas y con hiperlipidemia, los polisacáridos aplicados exógenamente causaron efectos en la disminución de la hiperlipidemia con respecto a la diabetes mucho mayor teniendo un cambio significativo (Meneses *et al.*, 2016; Eroğlu y Beytut, 2018)

Otro estudio realizado por Özevren *et al.*, (2018), sobre los efectos protectores de los polisacáridos de *G. lucidum* (GLPS) como antioxidante en los tejidos de las células del cerebelo después de la lesión cerebral traumática en ratas, donde el tratamiento con *G. lucidum* redujo significativamente el aumento en los niveles en la determinación de malondialdehído y restauró el contenido de GSH, disminuyeron la producción de mediadores inflamatorios por microglía activada y protegieron las neuronas dopaminérgicas contra el daño inflamatorio y oxidativo.

Los polisacáridos de *G. lucidum* también se han utilizado durante mucho tiempo como un medicamento tradicional para la reactivación y una larga vida, cuyo cuerpo hifal o sus componentes se informa que tienen varias actividades fisiológicas, entre ellas el anti hiperglucémico, debido a que contiene compuestos neuro activos que pueden inducir la diferenciación neural y prevenir la apoptosis de las neuronas.

Por otra parte, Sun *et al.* (2017), estudiaron los efectos neuroprotectores de GLPS contra la apoptosis inducida por estrés oxidativo en células cultivadas granulares de cerebelo. Se ha demostrado que los polisacáridos de *G. lucidum* suprimen la necrosis, protegen las estructuras neurales y la apoptosis neuronal, sin embargo, los estudios histopatológicos no revelan el mecanismo de actividad por lo que se necesitan más estudios para determinar la reacción y el punto donde se involucran estos polisacáridos (Özevren *et al.*, 2018).

El aumento de interés sobre este hongo se debe no sólo porque es un alimento saludable rico en polisacáridos y triterpenoides, sino también una fuente de biológica rica en compuestos activos de valor medicinal. Muchos de sus extractos pueden ser procesados como medicina complementaria y suplementos dietéticos.

Se han reportado contenidos de moléculas bioactivas en los extractos de *G. lucidum* con diferentes proporciones estas variaran de acuerdo con los factores ambientales, lugar de origen y la especie como se muestra en la tabla 1.

<b>Tabla 1. Ingredientes activos de <i>G. Lucidum</i></b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Contenido</b>
Tocoferoles	141 ±7 mg/100g masa seca
terpenoides	27.2 ± 0,7 mg equiv. linalol / g
triterpenoides	5.6 ± 0,5 mg equiv. ácido ursólico/g
polisacáridos	15.4 ± 0,2 mg equiv. amido/g
Radicales libres	0.73 ± 0,01 mg / mL
Poder reductor	0.15 ± 0,01 mg / mL
Anti-tirosina	2.81± 0,01 mg/mL
Ácidos triterpénicos	26 identificados (Ác. ganodéricos C2, A y H)
Fuente: Taofiq <i>et al.</i> , 2017	

*Ganoderma* presenta tres características para la prevención o tratamiento de enfermedades:

1. El uso de este hongo garantiza estar libre de cualquier toxicidad y al parecer ausencia de efectos secundarios;
2. No tiene efecto benéfico o tóxico dirigido para algún órgano en particular;
3. Sus efectos causan mejora sobre la normalización de la función de los órganos, es importante por sus propiedades con un alto potencial farmacológico como macrohongos y juega un papel importante en la prevención de enfermedades y el tratamiento en la medicina popular;

Esto ha sido comprobado a través de pruebas farmacológicas modernas, que han demostrado algunas acciones y propiedades de *Ganoderma* dentro las que se pueden incluir actividad inmunomoduladoras, inducen la producción de citoquinas, actividad antialérgica, antitumoral, antiinflamatoria, antiparasitaria, antioxidante, causando

beneficios sobre el sistema cardiovascular, sistema respiratorio, endocrinas y sistema metabólicas, etc. (Zhou *et al.*, 2012).

Cao y Lin (2006), aislaron una especie de péptido polisacárido (GLPS) con un peso molecular de 584.900 dalton a partir de un extracto de agua hirviendo del cultivo de madera *G. lucidum*, seguido de precipitación con etanol, diálisis, y agotamiento de proteínas, donde encontró que los GLPS pueden aumentar la expresión de mRNA así también del interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), también se ha demostrado que promueve la citotoxicidad específica de linfocitos T citotóxicos.

### **3.5 Consumo de *G. lucidum* en México**

México posee serios problemas de obesidad y enfermedades asociadas como diabetes, síndrome metabólico, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cáncer entre otras, mismas que han reportado un costo en el sistema de salud en 2017 mayor a \$12 900 millones de dólares en sus tratamientos, siendo un problema importante la fuente de alimentación ya que en su mayoría es procesada y de baja calidad (Chen, 1999), lo que conlleva a buscar alternativas viables e inmediatas como lo es proponer estrategias alimentarias más sanas.

Los hongos por otra parte han demostrado ser un alimento alternativo, existen hongos comestibles que constituyen un alimento nutricional y funcional y que se han logrado producir bajo condiciones controladas, en corto periodos de tiempo, venciendo condiciones adversas por cambio climático siendo una expectativa real a la solución de graves problemas de salud y nutrición. Por sondeo y encuestas en 2012 se reportó que un promedio de 62.3% consume hongos y 37.75% no son consumidores de hongos. Este incremento en el consumo de hongos en la sociedad mexicana es coherente con el incremento de producción a nivel nacional reportado en 58.5% siendo ellos un gran aporte a la seguridad alimentaria de la sociedad (López-Peña *et al.*, 2016).

Durante el periodo de 2003 a 2011 la mayor tendencia se detecta a comerlos en ensaladas, quesadillas, sopas, pizzas, en lugar de usarlos como guarnición en platos fuertes. Actualmente, aunque la cadena alimentaria emergente experimenta un

desarrollo endógeno y competitividad internacional aun requiere mayor atención. *G. lucidum* no es un hongo medicinal del cual la sociedad mexicana este ampliamente enterada de sus múltiples beneficios, el consumo de este hongo en México es menor que en cualquier país asiático, se ha reportado que el consumo promedio en ese continente es de un promedio de cuatro kilos per cápita anuales, mientras que en nuestro país esta cifra se reduce a 300 gramos (Esqueda *et al.*, 2010).

En México se han registrado alrededor de 16 especies (Mendoza *et al.*, 2011; López-Peña *et al.*, 2016), de las cuales *G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum* y *G. sessiliforme* están citadas para Sonora. El género es frecuentemente observado en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Torres-Torres *et al.*, 2012). En Sonora se conoce su distribución en la zona urbana de Hermosillo, Reserva Forestal Nacional y Refugio de Fauna Silvestre Ajos-Bavispe con características de bosque de pino-encino, bosque de galería y matorral desértico y Reserva de la Biosfera Sierra de Álamos-Río Cuchumaquic. Sin embargo, aún existen zonas poco exploradas, como en bosque de pino-encino, matorral subtropical y mezquital (Esqueda *et al.*, 2010; López-Peña *et al.*, 2016).

### **3.6 Ácido acetilsalicílico (AAS) como un señalizador de respuesta biológica**

Las plantas sobreviven a una serie de factores adversos a su desarrollo como por ejemplo estrés por calor, sequía, el aumento de la salinidad del suelo, presencia de plagas, enfriamiento, congelación, sequía, inundación, estado oxidativo, aumento de la concentración de sal, alelos químicos, radiación, luz, viento, presencia de metales pesados, etc., debido a que existen una serie de mecanismos de adaptación y aclimatación de éstas a su entorno. Estos mecanismos permiten una alto grado de plasticidad en su metabolismo celular donde existen compuestos llamados fitohormonas las cuales desempeñan un papel importante en un estado llamado "stay-green", este estado es un rasgo crucial para la mejora genética de varios cultivos, lo que permite a las plantas mantener un nivel elevado de su metabolismo fotosintético activo bajo condiciones de estrés, generando mecanismos para la producción de compuestos que activan defensa o soporte para mantener este estado "stay-green" (Abdelrahma *et al.*, 2017).

Las fitohormonas son un grupo de diversas moléculas de señalización que se encuentran en pequeñas cantidades en las células, encargadas de mediar las respuestas fisiológicas en plantas ante factores ambientales no favorables.

Algunos ejemplos de fitohormonas son las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico, otras agrupadas recientemente como grupos son los brasinoesteroides, jasmonatos de metilo, estrigolactonas y ácido salicílico y derivados. Sus roles fundamentales en la promoción de la aclimatación de las plantas a entornos en cambio constante, mediación del crecimiento, el desarrollo y la asignación de nutrientes han sido bien establecidos.

El ácido salicílico (AS) y el ácido acetilsalicílico (AAS) son compuestos de carácter químico fenólicos vegetales que ya han sido reconocidos como reguladores del crecimiento de las plantas involucrados en muchos procesos fisiológicos, incluida la fotosíntesis a través de una mayor producción de carbohidratos lo cual da una mejora en las plantas y semillas, directamente aumentando su metabolismo (Purcarea y Cachița-Cosma, 2008).

El ácido acetilsalicílico (AAS) es un derivado funcional del ácido salicílico (Raskin, 1991), ampliamente conocido como “la aspirina”. Fue la primera droga sintética del mundo que se produjo en 1897 por la Compañía de Bayer como agente antiinflamatorio al imitar la acción de la medicina antigua del sauce (Weissman *et al.*, 1991). Se realizaron estudios en 1970 con la aplicación de aspirina contra un virus de planta en hojas, demostrando ser efectivo el tratamiento de salicilatos para enfermedades y sus resistencias. La aspirina que es el ácido salicílico ha demostrado que este compuesto es un regulador del crecimiento generando respuestas de las plantas ante este compuesto, se destacan la estimulación de la oxidación mitocondrial el incremento de la embriogénesis somática en cultivo de tejidos, la protección a la luz ultravioleta entre otros (Anchondo-Aguilar *et al.*, (2011). También se demostró estar presente como hormonas vegetales clásicas produciendo nuevas sustancias de crecimiento natural con funciones reguladoras en cultivo de tejidos, una de estas sustancias es ácido salicílico y sus derivados como el ácido acetilsalicílico (Purcarea y Cachița-Cosma, 2008).

### **3.7 Efecto del Ácido salicílico y derivados adicionados endógenamente**

El ácido salicílico (AS) actúa como molécula de señal endógena que es responsable para inducir tolerancia al estrés abiótico en las plantas. Juega un papel importante en la regulación de crecimiento, desarrollo e interacción con otros organismos y respuestas de defensa a tensiones ambientales. El AAS no es esencial para la germinación bajo condiciones normales de crecimiento, pero juega un papel promotor en la germinación de semillas como se demostró en el estudio con *Arabidopsis thaliana* bajo alta salinidad mediante la reducción de daño oxidativo (Purcarea, y Cachiță-Cosma, 2008).

### **3.8 Efecto del ácido salicílico y derivados adicionados exógenamente**

El AS como aplicación exógena otorga una mayor tolerancia en ambientes salino a plántulas como se ha probado en pistacho, aumentando el nitrógeno, fósforo, potasio y contenido de calcio, así también incrementó la actividad de enzimas antioxidantes, contenido de glutatión, fotosíntesis y rendimiento final. Causó mejora en eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados con el crecimiento y desarrollo de las plantas. Como suplementación el efecto de AS ha demostrado mejora en los parámetros bioquímicos determinados en *Triticum aestivum* L. cuando fue sometido a estrés por salinidad (Florido y Álvarez, 2015; Purcărea and Cachiță-Cosma (2010).

Dentro de los efectos atenuantes de AS fue la mitigación de la fitotoxicidad del estrés por cloruro de sodio en *Zea mays* L. plántulas regulando los caracteres de crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos, prolina, contenido de agua relativa, porcentaje de fuga de electrolitos, enzimas antioxidantes y cambios en la anatomía de la hoja fueron notados. Otro caso reportado es el de *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., el cual presentó un incremento en la longitud la planta y raíz, pesos frescos y secos, así como glicina betaína y carbohidratos solubles totales, en las plántulas de pepino generó protección de salinidad y aumentaron los niveles de azúcares como glucosa, fructosa, rafinosa y estaquiosa que actúan como agentes osmóticos o nutrientes y como señales metabólicas (Nambiar *et al.*, 2012).



Se investigó en variedades de mostaza (*Brassica juncea* L.) viz., (tolerantes a la sal) donde se logró aumentar contenido de nutrientes, fotosintético y caracterización de crecimiento. En tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) donde se reguló los contenidos de azúcar, proteínas y prolina (Purcarea y Cachiță-Cosma, 2008).

### **3.9 Desarrollo de fármacos derivados de compuestos naturales y de *G. lucidum***

Muchas revisiones científicas han documentado la utilización de los recursos naturales, plantas, animales y microorganismos, entre otros, con fines medicinales debido a que existen un número de enfermedades de las cuales aún desconocemos su origen y las consecuencias que de ella deriven o bien por los efectos secundarios causado por los tratamientos aplicados para atenuarla.

También aquellas enfermedades que aún no tienen cura por lo que es importante continuar realizando investigaciones que ayuden a tratar dichas enfermedades, principalmente tratamientos de tipo no invasivos, no esteroides, que comprometan el estado de la persona enferma, disminuyendo efectos secundarios o efectos citotóxicos.

Una estrategia es la obtención de fármacos, es decir compuestos que surgen de diferentes investigaciones en la búsqueda de moléculas, con estructuras similares para ser empleados como tratamientos, durante los últimos cuarenta años se han sintetizado y ensayado nuevos compuestos derivados anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios, etc.

El resurgimiento de los productos naturales en el ámbito del descubrimiento de fármacos tiene su base en la introducción de nuevos enfoques, tecnologías y metodologías, incluyendo el diseño de moléculas bioactivas asistido por ordenadores, soportados por las investigaciones donde se explotan las propiedades funcionales y medicinales de plantas, animales y hongos, ejemplo de ello que a la fecha, existen varios medicamentos basados en la composición de *G. lucidum* y que están autorizados por el Estado de Administración de Alimentos y Medicamentos de China por sus siglas en inglés (SFDA) para uso clínico (Tabla 2).

**Tabla 2.** Medicamentos de *G. lucidum* autorizados por SFDA China.

<b>Nombre de la droga</b>	<b>Componentes</b>	<b>Beneficios</b>
Capsulas de <i>Ganoderma</i>	Extracto de <i>Ganoderma</i>	Insomnio, olvido, debilidad física, neurastenia
Tabletas de <i>Ganoderma</i>	Extracto de <i>Ganoderma</i>	Insomnio, olvido, debilidad física, neurastenia
Gránulos de Compuestos de <i>G. lucidum</i>	Extracto de <i>Ganoderma</i>	Hepatitis crónica
Jarabe de <i>G. lucidum</i>	-	Palpitaciones, insomnio, pérdida de apetito y neurastenia
Rebanadas de <i>G. lucidum</i>	Extracto de <i>G. lucidum</i>	Hepatitis crónica, neurastenia, mareos, insomnio, úlceras gastrointestinales, bronquitis crónicas, enfermedad coronaria.
Vino <i>G. longan</i>	Extracto de <i>G. lucidum</i>	Debilidad frágil posparto, anemia
Capsulas de <i>G. lucidum</i>	Extracto de <i>G. lucidum</i>	Deficiencia cardíaca y del bazo, adyuvante terapia para pacientes con cáncer
Gránulos de <i>Ganoderma</i>	Extracto de <i>G. lucidum</i>	Insomnio, olvido, debilidad física, neurastenia
Líquido oral de <i>Ganoderma</i>	Extracto de <i>G. lucidum</i>	
Capsulas de <i>Ganoderma</i> y <i>Ginseng</i>		Insomnio, olvido, debilidad física, Neurastenia.
Tabletas dispersables de <i>Ganoderma</i>		Debilidad física
<i>Ganoderma</i> en gotas	Pasta de <i>G. lucidum</i>	Insomnio, olvido, debilidad física, neurastenia, bronquitis crónica
Líquido para beber de <i>G. lucidum</i> y <i>gynostemma</i>	Extracto poderoso de esporas de <i>G. lucidum</i>	Insomnio, olvido, debilidad física, neurastenia.
Inyección de Polisacáridos de <i>G. lucidum</i> Karst	Extracto poderoso de esporas de <i>G. lucidum</i>	Insomnio, olvido, debilidad física, neurastenia, bronquitis crónica.

Fuente: Modificada de Zeng *et al.*, 2018.

Los polisacáridos de *G. lucidum* (GLPS) han sido identificados como uno de los principales componentes bioactivos dentro de la composición funcional se ha registrado en China como "Ji 731 Injection" desde 1973, la producción en escala de este medicamento inicia en 1985 y fue aprobado por la FDA China como "Inyección de polisacarido de *G. lucidum* Karst "(Ling Bao Duo Tang Zhu She Ye) en el año 2000 el cual fue aplicado intramuscularmente. Después de más de cuarenta años de uso clínico, su eficacia, seguridad y tolerabilidad a largo plazo han sido reconocidos por los neurólogos. Es uno de los pocos medicamentos no hormonales utilizados para tratar las miopatías refractarias. También se utiliza como una terapia combinada, que reduce la cantidad de glucocorticoide requerido para el paciente con miopatía, sin reacciones adversas, y mejora la calidad de vida de pacientes que han sido tratados con quimioterapias (Zeng *et al.*, 2018).

### **3.10 Métodos de extracción de compuestos bioactivos y funcionales**

#### **3.10.1 Extracciones en frío**

Muchas investigaciones son dirigidas a maximizar la producción y utilización de moléculas funcionales presentes en hongos como por ejemplo los polisacáridos, triterpenos, esteroides, lectinas y proteínas. Estas moléculas se han aislado de *G. lucidum* y otras especies estrechamente relacionadas. Dentro de los compuestos que son más ampliamente investigados están los polisacáridos bioactivos, los glucanos con una configuración,  $\beta$ -1-3 y  $\beta$ -1-6 D-glucano. La estructura básica de estos compuestos es  $\beta$ -1-3 D-glucopiranosido con 1 a 15 unidades de cadenas laterales de monoglucosido  $\beta$ -1-6.

Se han desarrollado numerosos métodos de extracción, cuyo objetivo es la obtención de extractos con mayores rendimientos y menores costos. Tal es el caso de la extracción con solventes orgánicos, disolventes como metanol, etanol y acetona. Un procedimiento preliminar para la extracción de polisacáridos de *G. lucidum* implica la extracción con disolvente. Como procedimiento general, existe una amplia similitud en los diversos métodos para extraer polisacáridos de los cuerpos fructíferos del hongo, del micelio y del medio líquido, sin embargo, estos métodos son inaceptables cuando el uso es para el humano (Askin *et al.*, 2010).

Existen varias técnicas novedosas para la extracción de antioxidantes naturales a partir de materiales vegetales, incluyendo extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción asistida por microondas (EAM) (Huang *et al.*, 2009).

**3.10.1.1 Maceración:** La maceración es un proceso que se emplea para extraer compuestos activos de un sólido hacia un líquido. La materia prima o producto sólido contiene ciertos compuestos que son solubles en el líquido que se utiliza como extractante y el propósito es precisamente el de extraer los compuestos presentes. El resultado final es un producto macerado (Huang *et al.*, 2009).

Para obtener extractos líquidos de los hongos medicinales se sumerge el hongo en un disolvente elegido, durante el tiempo necesario, cuidando que no exista una descomposición de los componentes. Este método se utiliza principalmente cuando el hongo contiene ciertos principios activos que podrían modificarse o perderse con un proceso diferente, como puede ser la temperatura por infusión, entre otros (Huang *et al.*, 2008).

La tintura es un ejemplo de maceración de plantas. Una tintura se elabora poniendo las plantas o cortezas molidas finamente en alcohol o vino tinto dentro de una botella, la cual se ha cerrado con una tapa hermética. El tiempo utilizado va a depender de la planta que se utilice. Se deberá agitar con suavidad una media hora o más como mínimo una vez al día (Huang *et al.*, 2009).

Existen, básicamente, dos tipos de maceración: En frío y en caliente

**Maceración en frío:** El elemento sólido se sumerge en la menor cantidad de líquido posible. Debe tener el suficiente como para cubrir totalmente del producto que se pretende macerar. El tiempo lo va a determinar el producto base. La maceración en frío tiene la ventaja de que se consigue extraer todas las propiedades de la materia prima sin que esta sea alterada.

**Maceración con calor:** Sigue el mismo proceso que macerar en frío, pero varía el medio en el que se va a extraer. También el tiempo necesario varía sustancialmente, pues el calor altera el proceso de extracción. Como referencia, podemos establecer que 3 meses de maceración en frío se corresponderían a 2 semanas de maceración en calor (caso de plantas y hierbas medicinales). Tiene una desventaja frente a

macerar en frío. La maceración en calor no consigue una esencia integral de la materia prima, además, se alteran ciertos compuestos termolábiles. Frente a esto se intenta dar solución acortando los tiempos de extracción mediante extracciones con corriente de vapor (Huang *et al.*, 2009).

**3.10.1.2 Ultrasonido:** El interés por los compuestos presentes en las plantas a nivel industrial hace necesario que se busquen técnicas de extracción de estos compuestos más eficientes y así incrementar su aplicación y de compuestos de interés o bien de subgrupos naturales de compuestos encontrados en distintas plantas, tales como las isoflavonas de la soya, los flavonoides, diversos antioxidantes y ácidos orgánicos de plantas, frutas, hongos cuyo uso ha reportado efectos biológicos positivos por lo que el área de extracciones a nivel industrial se incrementa así como su aplicación en el área alelopática, que consiste en usar sustancias propias de la planta para controlar el crecimiento de otras plantas (Huang *et al.*, 2009).

Las primeras aplicaciones fueron en 1917 no como una técnica usada para la obtención de compuestos químicos, sino en tecnologías de procesamiento. Existen diversos tipos de ultrasonido la cual es una técnica para extracción de compuestos en forma no invasiva ni destructiva, se divide en ultrasonido de señal y ultrasonido de potencia.

**Ultrasonido de señal**, en esta técnica el producto modifica la señal y esta modificación brinda información sobre dicho producto. Por ejemplo: grosor de cáscara, carcasa de animales vivos, medición de grosor de cáscara de huevo, etc. (Azuola y Vargas, 2007)

**Ultrasonido de potencia**, este método se considera una técnica prometedora para la industria de alimentos y fármacos, son señales de alta intensidad que utilizan frecuencia variable para producir cambios físico y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido, esto golpean la superficie sólida, requiriendo un medio líquido y una fuente de energía y un transductor el cual convierte la energía eléctrica o cinética en energía acústica. Este método presenta como ventajas de eficiencia y simplicidad sobre métodos tradicionales como extracción por solvente a temperatura ambiente, reflujo térmico y soxhlet (Azuola y Vargas, 2007).

Las técnicas que se emplean para la identificación de biocompuestos deben ser económicas, según el estudio de Azuola y Vargas (2007), la técnica de ultrasonido tiene una eficiencia 70 veces mayores que la extracción por solventes, 11 veces mayor que la extracción por destilación y 35 veces mayor que la extracción por Soxhlet para la recuperación de flavonoides en plantas.

**3.10.1.3 Microondas:** El método de extracción a base de microondas tiene ventajas asociadas sobre los métodos tradicionales de extracciones, ya que es un sistema de extracción sellado, esto permite que la temperatura del disolvente alcance su punto de ebullición a mayor presión y resulta en una mayor eficiencia de extracción de compuestos bioquímicos con menor tiempo de incubación.

La extracción a base de microondas se ha utilizado para obtener eficientemente fenoles de té, pectina de cáscara de naranja y aceites esenciales de las hojas de romero y menta, curcuminoides, se ha extraído óptimamente utilizando el método de microondas a base de líquido iónico (Sarma *et al.*, 2018).

### **3.10.2 Extracciones en caliente**

La extracción de agua caliente es la tecnología más utilizada para la extracción de polisacáridos, aunque se ha reportado que existe un rendimiento bajo de recuperación de polisacáridos, por lo que se sugiere investigar más sobre técnicas de extracción de compuestos funcionales de hongos (Askin *et al.*, 2010).

Junto con esta tecnología se ha usado el ultrasonido o microondas que son técnicas de extracción asistida con el objetivo de acelerar y mejorar los rendimientos de obtención de compuestos bioactivos. Sin embargo, se reporta que solo el 3% de experimentos preliminares no tan fueron eficientes, ya que aún quedaban polisacáridos en el agua (Huang *et al.*, 2010).

También se utiliza extracciones a un pH alcalino, con condiciones óptimas de extracción a una temperatura de 60 °C, un tiempo de 77.3 min, con hidróxido de sodio a una concentración del 5.1%. El rendimiento del polisacárido de *G. lucidum* fue de 8.21% (Askin *et al.*, 2010). Otros métodos de extracción convencionales son como la extracción de agitación y la extracción de Soxhlet, que generalmente consumen mucho tiempo y laboriosos (Huang *et al.*, 2009).

### **3.10.3 Extracción en fluidos supercríticos**

El agua subcrítica como disolvente no polar puede extraer sustancias hidrófobas por lo que ha sido ampliamente aplicado a diversas técnicas de purificación, incluida la extracción de diferentes clases de compuestos a distintas temperaturas (Askin *et al.*, 2010).

Recientemente, la técnica supercrítica con dióxido de carbono (SCCO<sub>2</sub>) y el agua caliente a presión o el agua subcrítica ha cobrado gran interés como solvente alternativo para la extracción de compuestos naturales activos. El SCCO<sub>2</sub> es la elección para la separación de los compuestos deseados sin dejar residuos tóxicos en extractos y sin riesgo de degradación térmica de productos procesados como hierbas, especias, frutas y vegetales (Askin *et al.*, 2010).

El uso de este tipo de extracciones es una tecnología que tiene una serie de ventajas tales como: son limpias, rápidas, económicas, eficientes, tiene la posibilidad de automatización y buena selectividad debido a la facilidad de modificar la polaridad del medio de extracción (Askin *et al.*, 2010). Existen dos tipos de extracción en esta técnica, una extracción semicontinua y una extracción continua en ambos casos usando chaquetas de calentamiento y de bombas a alto vacío, con la finalidad de extraer más eficientemente los compuestos funcionales (Huang *et al.*, 2009).

### **3.10.4 Estudios realizados para caracterización química de *G. lucidum***

En los últimos años, los productos naturales aislados de hierbas y plantas han recibido una atención sustancial por su potencial como nuevos medicamentos contra una amplia variedad de enfermedades entre ellas el cáncer (Wang *et al.*, 2018). *Ganoderma* con sus diferentes especies es muy utilizada para obtener o sintetizar diversos fármacos contra estas enfermedades y también se usan como alimentos funcionales. *G. lucidum* en particular, produce varios metabolitos con actividad biológica, por ejemplo, compuestos terpenoides, exopolisacaridos y polisacáridos en general, que han demostrado ser responsables de las propiedades medicinales (Ye *et al.*, 2018; Esmaeilzadeh *et al.*, 2019).

Se ha encontrado que los ácidos ganodéricos poseen efectos hepatoprotectores, antihipertensivos, anti-VIH, hipocolesterolémicos, antihistamínicos, antitumorales y diversos efectos sobre la agregación plaquetaria y la inhibición del complemento. Los exopolisacáridos poseen efectos antitumorales a través de la inmunomodulación y la anti-angiogénesis.

Además, los polisacáridos tienen efecto protector contra los radicales libres que reducen el daño celular causado por mutágenos (Esmailzadeh *et al.*, 2019). Debido a estas propiedades el estudio y la farmacología de *G. lucidum* es mayor cada vez, tal como en el caso de su aplicación en tratamiento de lesiones de la médula espinal, en ratas, donde se les administró polisacáridos de *G. lucidum* (GLPS) en una dosis de 400 mg/kg/día a través de sonda gástrica. Análisis histológicos, posteriores de las enzimas producidas por la presencia de los exopolisacáridos determinando por espectrofotometría la actividad enzimática se encontró que el extracto de *G. lucidum* redujo las expresiones de los factores proinflamatorios y citotóxicos de la microglía activada y protegió eficazmente las neuronas dopaminérgicas contra el daño inflamatorio y oxidativo celular (Huang *et al.*, 2009; Aysun *et al.*, 2018).

Se ha reportado que los polisacáridos de *G. lucidum* están compuestos de l-arabinosa, d-manosa y d-glucosa en una proporción molar de 1.329:0.372: 2.953 así también se han detectado un total de 17 aminoácidos conjuntos con los polisacáridos y péptidos (Wang *et al.*, 2018). Se ha demostrado que los GLPS son eficaces para inhibir el crecimiento de tumores *in vivo* a través de múltiples mecanismos, particularmente a través de la activación de células efectoras inmunes como los linfocitos, macrófagos y células asesinas naturales, también se ha descubierto que los GLPS inhiben los procesos de neovascularización inducidos por tumores (Boh, 2013).

Debido a que los GLPS son tan importantes se han realizado diferentes modificaciones para su obtención y lograr optimizar sus funciones ya sea por la obtención de GLPS en la forma común, es decir ,por sustratos de maderas o bien a partir de gramíneas (Lin *et al.*, 2003) logrando con esto modificar la composición de aminoácidos y sus pesos moleculares los cuales se determinan mediante cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento (HPGPC) y sistemas HPLC, haciendo una identificación de los monosacáridos por el tiempo de retención de los



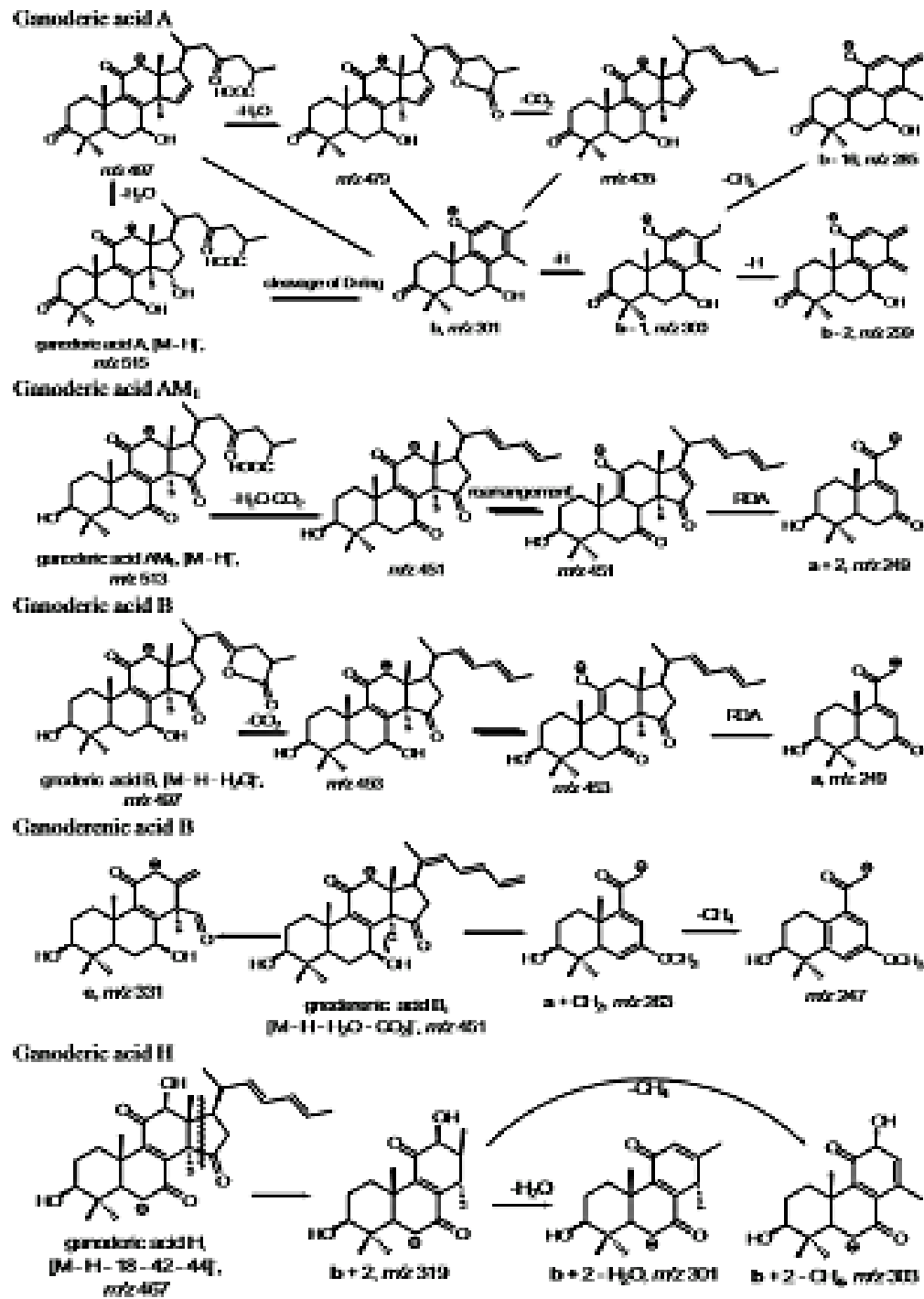
picos generados por comparación de estándares como ramnosa, fructosa, xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa (Boh, 2013) .

Se han detectado 17 aminoácidos en péptidos de *G. lucidum* que incluyen a Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Arg y Pro, con una relación de masa respectiva de: 1.45:1.08:1.12:1.45:0.84:0.87:0.19:0.64:0.01:38:0.56:0.23:0.47:0.58:0.30:0.53:0.60 (Boh, 2013).

*G. lucidum* así como otros hongos son cada vez más importantes como alimento y también como medicina debido a su contenido fenólico y antioxidantes. El perfil de la composición fenólica de estos hongos se ha estudiado y determinado por técnicas como el método del reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y ensayos de potencia antioxidante reductor férrico, para determinar la captación de radicales y los compuestos fenólicos. (Kim *et al.* 2006; Can *et al.* 2014).

Otros compuestos de suma importancia en la composición de *G. lucidum* son los terpenos, que generalmente son analizados por la técnica de cromatografía líquida de fase reversa optimizada con detección de un detector de diodos y espectrometría de masas en tándem con trampa de iones por electropulverización (HPLC-DAD-ESI-MS). De estos se podrían clasificarse en cinco tipos dependiendo del comportamiento de fragmentación bajo estas condiciones (Figura 5).

Esto ha dado como resultado la información clave de fragmentación, obteniendo que la división en los anillos C y D a pesar de las pérdidas predominantes de H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> dan un total de 38 triterpenoides en *G. lucidum* que se han caracterizados en función del espectro de masas en tándem de los picos de HPLC (Yang *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Vía de fragmentación de terpenos por HPLC-DAD-ESI-MS (Yang *et al.*, 2007)

Existen también estudios donde se ha intentado incrementar la producción de compuestos funcionales que ya están en la naturaleza de *G. lucidum* donde se han reportado que el contenido de polisacáridos y triterpenoides en de los cuerpos fructíferos es de alrededor del 0,5% y el 1,0% (Chen *et al.* 2007), respectivamente. Esto limita los beneficios para la salud y la eficacia terapéutica de este hongo, por lo que se ha tratado de promover la producción de más compuestos adicionando calcio y ácido salicílico (AS) en el sustrato, obteniendo como resultado que el calcio adicionado no interviene en la producción de triterpenos mientras que el AS aumentó el contenido de triterpenoides en un 23,32%, la inducción combinada incrementó el contenido de polisacáridos y triterpenoides en 9.02% y 13.61%, respectivamente (Ye *et al.*, 2018).

Los triterpenoides se sintetizan a través de la vía del mevalonato por medio de una serie de reacciones químicas, formando primero al escualeno, y finalmente a lanosterol. La determinación de triterpenoides se ha determinado en función de una reacción de coloración que involucra vainillina-ácido perclórico, ácido acético glacial y ácido ursólico con triterpenoides, por absorción según lo descrito por Chen *et al.*, (2007).

#### IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

*G. lucidum* es uno de los hongos medicinales más conocidos y empleados en China y el mundo, que al igual que muchas plantas medicinales se usan como nutraceuticos, existen diversas formas de aprovecharlo como lo es a través de la obtención de sus extractos ricos en compuestos como taninos, flavonoides, terpenos, esteroides, azúcares, glucanos y proteínas (Yamashita, *et al.*, 2015). Sin embargo, existen poco apoyo en la generación de políticas públicas transversales que permitan promover productos que contengan este hongo, de uso etnológico, con un aprovechamiento sustentable.

El principal problema es que al tratar de promover estos productos no se encuentran homogenizados en su contenido por lo que no garantizan su efectividad. El Colegio de Posgraduados *Campus* Puebla, se encuentra promoviendo un paquete biotecnológico basado en su investigación, el cual propone una solución a esto, en materia de hongos, particularmente en *G. lucidum* para lo cual se podrían encontrar plataformas importantes como promotor de los productos naturales por lo que el generar información para un futuro poder hacer el registro de este producto es muy importante .

En la página electrónica Institucional de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), establece algunos lineamientos donde indica que es necesario generar el conocimiento para fundamentar el uso y consumo seguro de productos alimenticios y medicinales. Como lo menciona “con fundamento en los artículos 39 de la ley Orgánica de la administración Pública Federal 4o., fracción III, 194, fracción I, 212 y 215, fracciones I y V de la Ley General de Salud; 1o., fracciones VIII, IX y XVII, 22, 117, 128, 132 y 169 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, y 5o., fracción XVII del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y Considerado en el Programa de Nacional de Salud 2014-2019 que establece la regulación y el control de los riesgos sanitarios que tienen como propósito proteger a la población contra aquellos factores o eventos exógenos que ponen en peligro la salud o la vida humana” citado en los artículos 234 y 245 de la Ley General de Salud indican que debe existir información que respalde al producto como una medida de protección a la salud de la población.

No existen productores que garanticen productos 100% confiable en cuanto a productos de hongos y sus derivados en sus diferentes presentaciones, por lo tanto, el contar con un paquete biotecnológico que garantice dichas propiedades es necesario. El cultivo de *G. lucidum* y sus productos enriquecidos permitirá desplazar del comercio a los “productos milagro” que son una serie de productos que no cumplen con un sistema de calidad estandarizado. Como ejemplo de esto, el producto conocido como “Charakani” que numera los beneficios de *G. lucidum*, sin embargo COFEPRIS ha impuesto leyendas que advierten esta situación como “El producto no ha sido evaluado por la autoridad sanitaria, por lo que no se han comprobado los efectos terapéuticos que se le atribuyen”, “El uso de este producto puede sugerir el abandono de un tratamiento prescrito por un médico para los problemas de salud” y “Este producto puede no ser seguro y dañar la salud de los consumidores” (Cofepris, 2018).

Esto hace necesario que exista un mayor estudio de las propiedades benéficas, medicinales y probióticas de este hongo a la salud del humano debido a la presencia de compuestos propios del hongo y por un incremento en su concentración, esto se logra por la propuesta de la adición de ácido acetilsalicílico para la estimulación de una mayor expresión de compuestos probióticos y nutraceuticos como se refiere en el presente trabajo y en lo reportado con bioensayos de Meneses *et al.*, (2016), donde se comprueba el efecto de adición de ácido acetilsalicílico (AAS) por lo que es importante caracterizar e investigar la naturaleza química de las moléculas bioactivas presente en estos y determinar si son benéficos al ser humano.

## **V. HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

### **5.1 Hipótesis**

Existe un incremento en la producción de moléculas bioactivas en extractos obtenidos de los basidiocarpos de *G. lucidum* con la adición de ácido acetilsalicílico durante su cultivo. El incremento de estos compuestos potencializa las propiedades funcionales y medicinales en la salud humana.

### **5.2. Objetivo general**

Caracterizar fisicoquímicamente los extractos hidroalcohólicos de basidiocarpos de *G. lucidum* mexicano cultivados de forma tradicional y con adición de AAS y evaluar a través de las moléculas bioactivas presentes, el impacto potencial de sus propiedades medicinales y funcionales en la salud humana.

#### **5.2.1 Objetivos específicos**

Obtener basidiocarpos de cultivo tradicional y basidiocarpos con sustratos adicionados con AAS.

- Obtener el extracto hidroalcohólico de los basidiocarpos de *G. lucidum* obtenidos de cultivos tradicional y cultivo con adición de AAS.
- Caracterizar los extractos hidroalcohólico de los basidiocarpos de *G. lucidum* obtenidos de cultivos tradicional y con adición de AAS.
- Proponer una estrategia que permita Impulsar la aplicación del paquete biotecnológico de mejoramiento de las propiedades de *G. lucidum* a través de la adición de AAS en base a los resultados obtenidos de las caracterizaciones.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diagrama general de la metodología

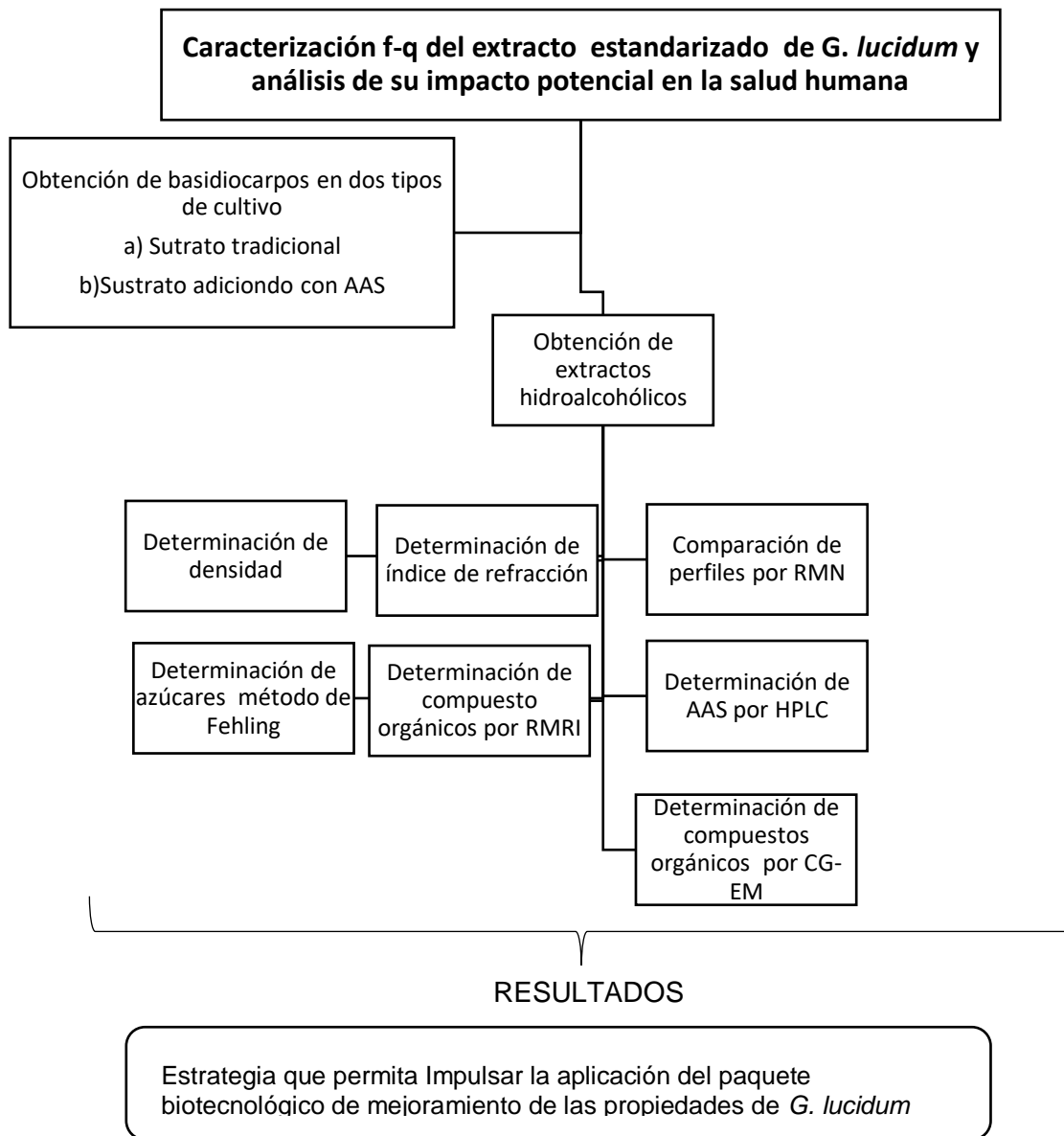


Figura 6. Diagrama general de metodología.

## 6.2 Obtención de basidiocarpos

El material biológico utilizado fue *G. lucidum* (Curtis) P. Karst y catalogado como la cepa CP-145, que se encuentra depositado en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, *Campus* Puebla, México del Colegio de Posgraduados (CREGEN-HCFM) (Figura 7).

Los basidiocarpos se cultivaron en sustratos sólidos estériles a base de serrín de encino, con la formulación estandarizada de cultivo, en bolsas de polipropileno con capacidad de 2 kilogramos con un microfiltro para el intercambio de gases.

Cada bolsa se inoculó con 50 g semilla de *G. lucidum*, posteriormente se incubó a 24-25°C en oscuridad, se fructificaron a 20-25°C con una humedad relativa del 60-70% (figura 8), obteniéndose dos tipos de basidiocarpos: los que se adicionaron en el sustrato con AAS a una concentración de (10 mM) y basidiocarpos con cultivo tradicional (control) (Meneses *et al.*, 2016).



**Figura 7.** CP-145 *Ganoderma lucidum* (Curtis) aislado por el personal del CREGEN-HCFM.





**Figura 8.** Cultivo de *G. lucidum* sobre aserrín de encino en bolsas de polipropileno con filtro, bajo condiciones controladas.

### 6.3 Sustancias químicas y reactivos

El ácido acetilsalicílico  $\geq 99,0\%$ , dimetilsulfóxido (DMSO) grado HPLC,  $\geq 99,7$  N, O Bis (trimetilsilil) acetamida (BSTFA) con trimetilclorosilano (TMCS) agente derivatizante y Metanol-D4  $\geq 99,8$  átomo, se adquirieron de Sigma-Aldrich, E.U.A., ácido ganoderico C2 (3B, 7B, 15A, 25R3)-,7 ácido 15-trihidroxi-11,23dioxo-lanost-8-in-26-oico CAS: 103773-62-2 de ChromaDex E.U.A. Todos los demás productos químicos utilizados fueron de pureza grado analítico.

### 6.4 Obtención de extractos hidroalcohólicos

Los extractos de los basidiocarpos se obtuvieron de la siguiente forma: se pesaron 100g de material biológico (*G. lucidum* cultivo tradicional) seco y molido, se maceraron con 1000mL de etanol al 32% durante 24 horas, pasado el tiempo se filtró en papel filtro con poro medio, el extracto filtrado se concentró en un rotavapor (Hanshin) a presión reducida y temperatura de 38°C y 90 rpm hasta obtener un volumen menor de 100 mL, se aforó a 100 mL con el mismo tipo solvente (nuevo), el cual también se utilizó para el lavado del matraz en el que se concentró el extracto (Figura 9).

La misma operación se realizó, pero ahora con 100g de basidiocarpos de hongo adicionado con AAS a una concentración de 10 mM (cultivado con adición de AAS en

el sustrato). Procedimiento patentado por (Martínez-Carrera *et al.*, 2014, MX322035-B, 8 julio), (Meneses *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Obtención de extractos hidroalcohólico al 32%.

## 6.5 Caracterización de los extractos

Se establecieron parámetros fisicoquímicos que permitan medir las diferencias de una forma sencilla y rápida, así como el uso de técnicas que nos permitan la identificación de la composición en el contenido de ambos extractos.

### 6.5.1 Determinación de la densidad

La densidad en una sustancia es una propiedad intensiva de la materia, con afectación de la temperatura, está dada por el cociente de la masa de la sustancia por cada unidad de volumen, se determina a través de la expresión de:

$$\delta = \frac{m}{v}$$

Donde

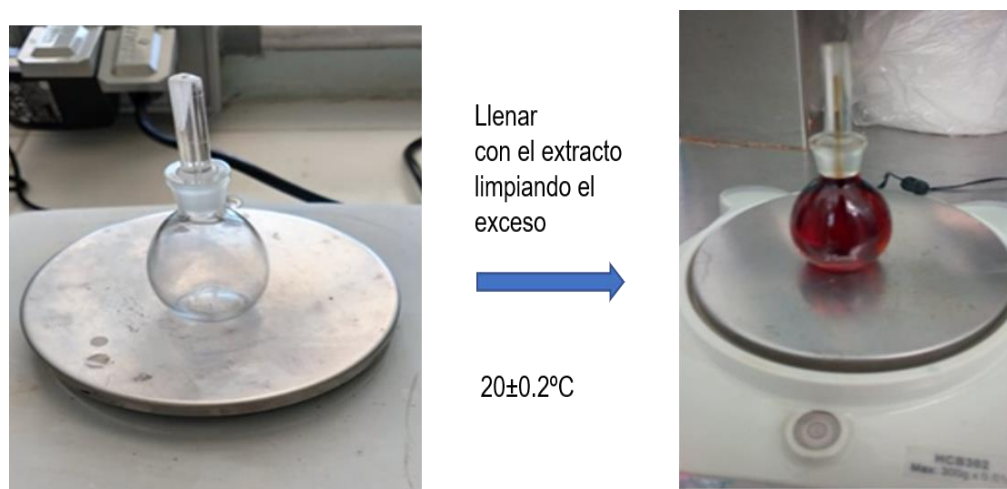
$\delta$ = es la densidad

m=es la masa de la sustancia y v=es el volumen

La densidad se determinó por medio de un picnómetro de 25 mL (marca Kimax, USA) perfectamente limpió lavado con acetona y seco, se determinó la masa del picnómetro completo; se tara en una balanza analítica (marca Ohaus), se procedió a llenado con el extracto homogenizada evitando la formación de burbujas de aire, se midió la temperatura con un termómetro a continuación se tapó el picnómetro

permitiendo que la muestra subiera por el capilar de la tapa limpiando el exceso que pudiera derramar (Figura 10).

Se realizaron tres mediciones durante los próximos 30 minutos controlando la temperatura a  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  la expresión de los datos se manejó hasta la tercera cifra decimal.



**Figura 10.** Determinación de densidad en los extractos control y adicionado con AAS por el método del picnómetro.

### 6.5.2 Determinación del índice de refracción

A los extractos obtenidos partir de los basidiocarpos *G. lucidum* se midieron los índices de refracción siendo este el criterio que se utiliza como indicador aproximado de los sólidos presentes en soluciones que contengan principalmente sacarosa (NMX-F-436-SCFI-2011).

Primeramente, se limpia el prisma del refractómetro ABBE (ATAGO, NAR-1) con etanol y un paño suave y limpio, se colocaron 2-3 gotas de agua destilada para calibrar el equipo a un valor de 1.333 a  $25^{\circ}\text{C}$ , se limpió nuevamente el prisma y posteriormente se colocaron 2-3 gotas del extracto en el refractómetro. Observar la escala del refractómetro y se anotó la lectura indicada a  $25^{\circ}\text{C}$  (Figura 11).



**Figura 11.** Refractómetro ABBE utilizado para determinación de índice de refracción de los extractos.

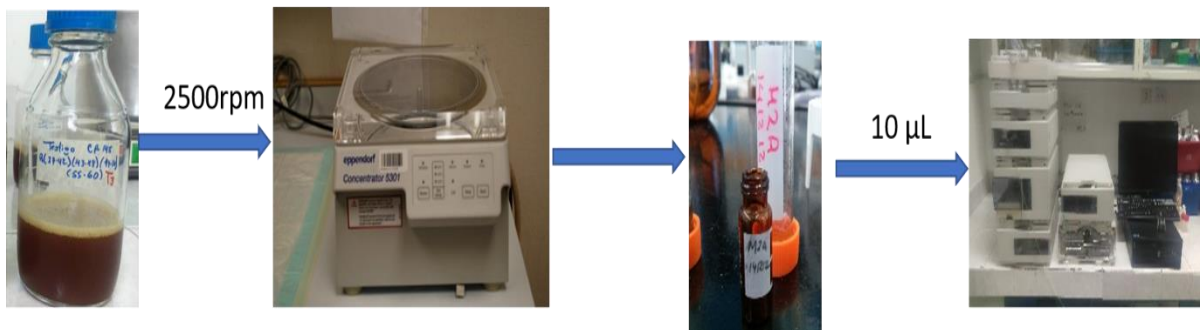
### **6.5.3 Determinación y cuantificación del ácido acetilsalicílico en los extractos**

#### **6.5.3.1 Determinación de AAS**

La presencia del AAS en el extracto de los basidiocarpos de *G. lucidum* se realizó utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Agilen Technologies 1100) con columna C18 (250 x 4.6 mm x 5 $\mu$ m) a un flujo de 1.0 mL/min, la fase móvil agua:metanol:ácido fosfórico (500:400:100) isocrático. Se preparó un estándar de 14  $\mu$ g/mL de AAS disuelto en metanol y se inyectó 10  $\mu$ L directamente en forma manual en el cromatógrafo HPLC, con las condiciones ya mencionadas. Para establecer el tiempo de retención del AAS (Pauwels *et al.*, 2012)

#### **6.5.3.2 Cuantificación de AAS**

La cuantificación del AAS en los extractos se realizó a través de una curva de calibración en un rango de 2.65 a 63.6  $\mu$ g/mL, se determinó la linealidad del método, continuando con la repetibilidad y reproducibilidad del método inyectando 7 veces la concentración de 40 $\mu$ g/mL y finalmente la exactitud con la misma concentración (ISO 10012:2003). Las muestras homogenizadas, se centrifugaron a 2500rpm en una (centrifuga Eppendorf) a 25°C, para eliminación de partículas suspendidas, en todos los casos se inyectaron 10  $\mu$ L en forma manual al HPLC (Figura 12), (Pauwels *et al.*, 2012).



**Figura 12.** Diagrama de trabajo para la determinación de AAS por HPLC.

Para el cálculo de la linealidad se determinó por ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = respuesta de detección

m = pendiente

x = concentración

b = ordenada al origen (ISO 10012:2003)

#### 6.5.4. Comparación del contenido en los extractos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se colocó 1mL del extracto en un vaso de precipitados de 5mL se llevó a sequedad a 45°C en un horno de secado (Goldbrunn400), una vez seco se disolvió en 0.7 mL de metanol deuterado (Metanol d<sub>4</sub>) se homogenizó perfectamente. Posteriormente, se filtró con algodón previamente desengrasado con éter de petróleo y seco para la eliminación de partículas, el filtrado se llevó al tubo de 0.5mm de la muestra del equipo con ayuda de una pipeta Pasteur, se colocó el tubo en el equipo de RMN (Bruker BioSpin Gmb) a un espectro de 500 MHz a 27°C, se corrió el método de acuerdo con método operativo del equipo.

Se determinó para cada extracto el perfil de protones (<sup>1</sup>H) y carbono (<sup>13</sup>C) los perfiles obtenidos se compararon con los resultados reportados por Roy *et al.*, (2009).



**Figura 13.** Espectrofotómetro de RMN usado en la comparación de perfiles de los extractos

### **6.5.5 Determinación de polisacáridos por el método de Fehling.**

Esta técnica se utilizó para determinar el contenido de azúcares reductores en forma de glucosa o alguna otra aldosa, polímeros de glucopiranosidos y polialcoholes presentes en los extractos de *G. lucidum*. En este ensayo, la presencia de aldehídos, pero no de cetonas se detecta mediante la reducción de la solución azul oscura de cobre (II) a un precipitado rojo de óxido de cobre insoluble. Se prepararon dos soluciones: la "A" de Fehling utiliza 7 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  disueltos en agua destilada que contenía 2 gotas de ácido sulfúrico diluido. La "B" de Fehling usa 35 g de tartrato de potasio y 12 g de NaOH en 100 ml de agua destilada.

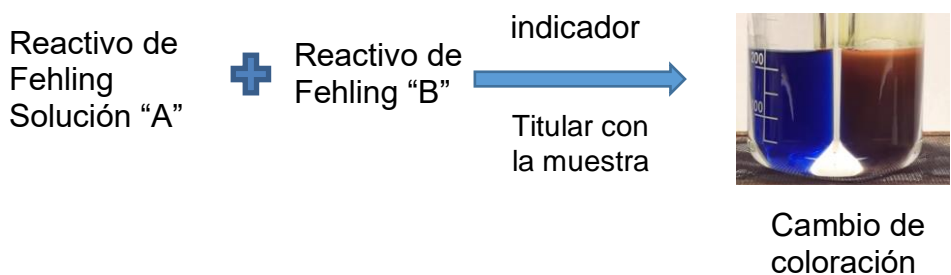
Se preparó el licor de Fehling con 15 ml de solución "A" que contiene sulfato de cobre pentahidratado al 7% con 15 ml de solución "B" que es tartrato sódico-potásico al 35%, se llevó a calentamiento a  $60^\circ\text{C}$  con agitación constante.

Se adicionó el extracto a una bureta de 50mL (Kimax), recordar eliminar las burbujas del sistema.

Se fue adicionando la muestra del extracto a una velocidad de 3 gotas/segundo, al matraz que contiene el licor de Fehling en calentamiento, la coloración azul intenso de la solución cambia a azul celeste durante al menos 1.5 minutos, en este momento se adicionaron 3 gotas de indicador de azul de metileno, y se continuó con el calentamiento hasta obtener un color amarillo con precipitado rojo (Figura 14).

Se midió el gasto de la muestra que se tituló. Se usó glucosa a 1 mg como estándar (Cardoso *et al.*, 2001; Laine *et al.*, 2002).





**Figura 14.** Reducción de azúcares por la técnica de Fehling.

Con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de azúcares reductores con la siguiente formula:

$$\text{Azúcares Reductores} = \frac{\text{Factor de Fehling}}{\frac{1 \text{ ml de muestra}}{100 \text{ ml de aforo}} * \text{ml de vol de titulación}}$$

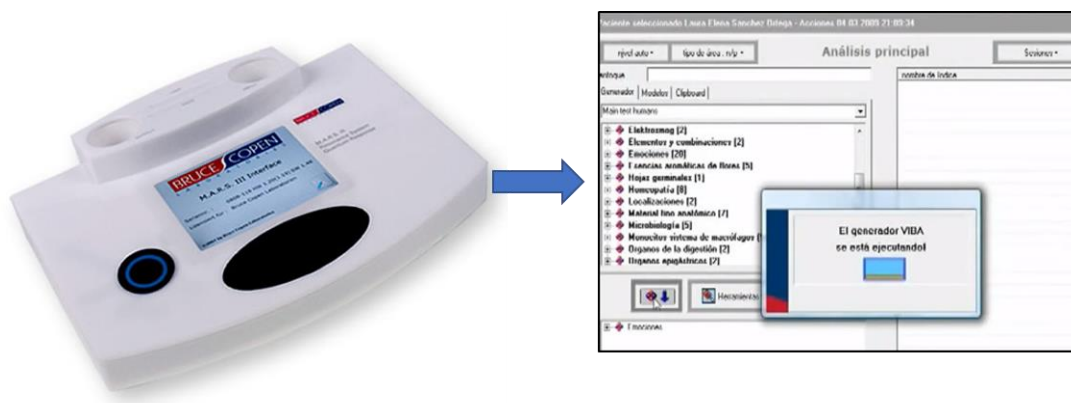
### 6.5.6 Identificación de compuestos orgánicos por Resonancia Magnética Radio Iónica (RM RI)

Esta técnica se ha propuesto recientemente para el análisis de vegetales y suelos. Los extractos fueron sometidos al analizador de resonancia magnética cuántica (MARSIII, Bruce Copen), donde se escanearon varios compuestos como aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas, carbohidratos, grasas y proteínas, todos ellos fueron por comparación de la proporción de la abundancia de compuestos presentes en ambos extractos y la identificación de estos compuestos con la base de datos del analizador (Figura 15).

La medición es directa ya que la muestra se coloca directamente en la superficie de la celda del analizador y la lectura se obtiene en una escala de respuesta de abundancia, las ventajas que presenta es que no hay una manipulación de la muestra, ni gasto de reactivos.

La muestra se coloca directamente en el porta muestras del equipo obteniendo una lectura a los 10 segundos, sin el uso de solventes, reactivos u otro tratamiento. El analizador tiene una base de datos donde se seleccionan los compuestos de interés para ser monitoreados en este caso polisacáridos, generando una tabla de datos que

comparó los resultados de la muestra con las referencias del software, la respuesta se da en abundancia (<http://copen.com.mx/nueva/mars3-analisis.php>).



**Figura 15.** Analizador de Resonancia magnética cuántica radio iónica (<https://www.copen.us>).

## 6.5.7 Determinación de compuestos por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM)

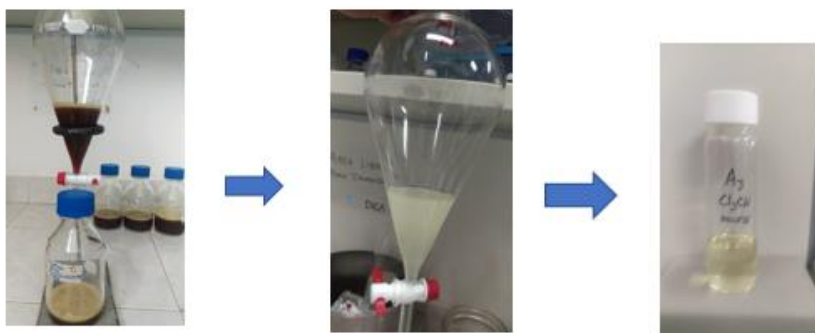
### 6.5.7.1 Preparación de la muestra con extracción con cloroformo

Se colocaron 100 mL del extracto en un embudo de separación de 1L (Kimax) y 10 mL de cloroformo grado HPLC, se realizó una extracción liquido-líquido durante 5 minutos con agitación contante y vigorosa, se realizaron tres extracciones por cada extracto, se dejó separar las fases y se filtró con un papel filtro poro fino, que contenía una capa de sulfato de sodio anhidro, el filtrado se llevó a concentración a 2 mL en rotavapor (Hanshin), se inyectó 1 uL en el cromatógrafo de gases acoplado a masas (Figura 16).

Posteriormente, el concentrado obtenido se llevó a analizar por cromatografía de gases acoplado a masas, el cual se realizó utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890), acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent, Espectrómetro de masas 5975) (CG-EM), se inyectó 1  $\mu$ L del extracto bajo las siguientes condiciones cromatográficas: columna DB-5MS de 0.5 $\mu$ m\*30m\*0.25 $\mu$ m DI, temperatura del inyector 180°C, temperatura del detector 220°C, con una rampa que inicia 56°C/1min, 10°C/1min, 196°C/1min, 20°C/1min, 260°C/5min., Inyector en modo split/spitless.



Posteriormente, al análisis de las muestras, se obtuvo un cromatograma con los compuestos contenidos en cada muestra el cual fue analizado y comparado con la biblioteca NIST08.



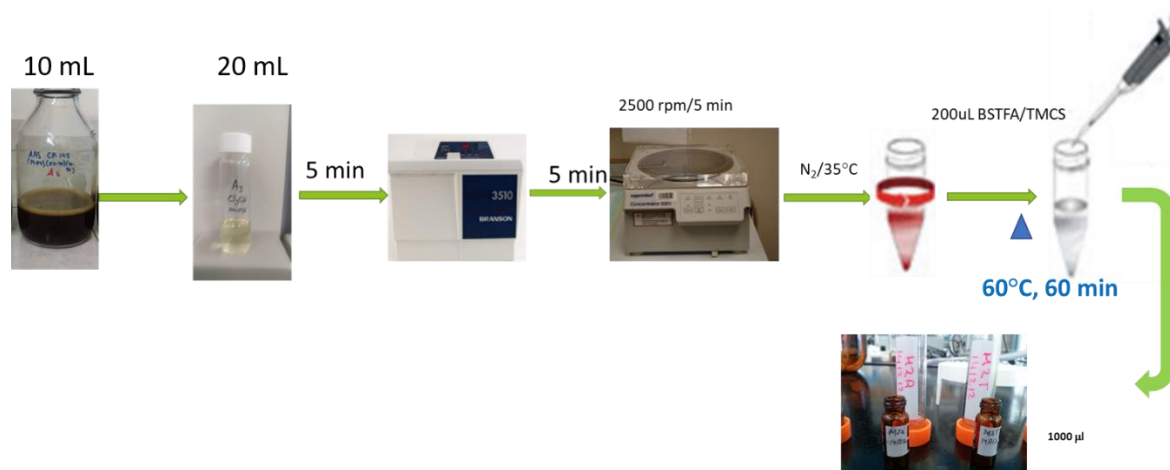
**Figura 16.** Extracción líquido-líquido con cloroformo de los extractos de *G. lucidum*.

#### **6.5.7.2 Extracción con trimetilclorosilano (TMCS) para polisacáridos y polialcoholes por CG-EM**

Comúnmente la detección de polisacáridos en muestras de esta naturaleza se determina por cromatografía líquida de alta resolución (*high pressure liquid chromatography*, HPLC) debido a que la mayor composición del extracto es de naturaleza hidrofílica, esto hace que la capacidad de separación y la sensibilidad de los sistemas LC son generalmente más altas que las obtenidas utilizando métodos CG-EM. En el caso de CG el análisis requirió una mayor manipulación de la muestra como es el caso de la derivatización de los compuestos como los azúcares, para conferir mayor estabilidad, que generalmente se basa en la metilación del monosacárido/metilglicósido usando trimetilclorosilano (TMCS), determinando estos compuestos a través de la formación del éster correspondiente (Sárossy *et al.*, 2012).

La extracción para la identificación de compuestos orgánicos por derivación con TMCS se llevó a cabo en un vial de reacción de 40 mL, se pipetearon 10 mL de del extracto muestra, se adicionó 20 mL de disolvente de extracción (acetonitrilo: agua: ácido acético, 25: 75: 5 v / v / v). La muestra se mezcló durante 5 minutos y se dejó estabilizar durante 5 minutos, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos a

temperatura ambiente, el sobrenadante se eliminó y se llevó a sequedad con una corriente de N<sub>2</sub> a 35°C, el residuo seco se redisolvió en 200 µL de N, O Bis (trimetilsilil) acetamida (BSTFA) con 1% (TMCS) agente de derivación, se calentó a 60°C durante 1 h en un horno de secado (Goldbrunn400), con agitación frecuente, después de lo cual se deja enfriar a temperatura ambiente y se concentra a 1 mL en rotavapor (Hanshin) antes de ser analizado por CG-EM (Figura 17) (Scotter *et al.*, 2007).

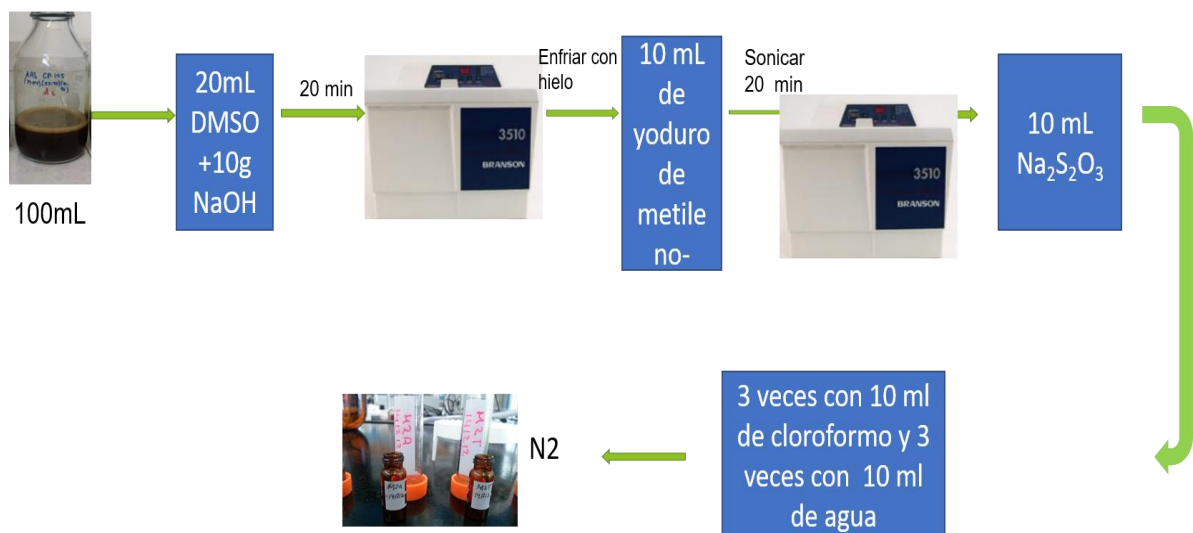


**Figura 17.** Diagrama general de derivatización de los extractos de *G. lucidum* con TCMS para polisacáridos y polialcoholes.

### 6.5.7.3 Extracción con dimetilsulfóxido (DMSO) para detección por CG-EM

La derivatización con DMSO se llevó a cabo usando 100 mL del extracto, se disolvió en 20 mL de dimetilsulfóxido, se adicionó posteriormente 10 g de NaOH, se sónico durante 20 min. Después se enfrió en hielo, 10 mL se añadió me y se sónico durante 20 min a 18-20°C. Después de enfriar, se añadió de nuevo yoduro de metilo y se trató con ultrasonidos durante 20 min. Se añadió agua (10 mL) que contenía 4 mmol / L de tiosulfato de sodio para detener la reacción de metilación.

La solución metilada fue extraída con tres lavados de 10 mL de cloroformo y 10 mL de agua, al separarse las fases se recuperó la fracción orgánica (Figuro 18). Como último paso se filtró en papel filtro poro fino con una capa de sulfato de sodio anhidro y se llevó a volumen de 2 mL con N<sub>2</sub> (Li and Lu, 2012).



**Figura 18.** Diagrama general del proceso de extracción con derivatización DMSO para detección de ácidos orgánicos.

## 6.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y su respectiva comparación por el método de Tukey, el nivel de significación se estableció en  $p < 0,05$  utilizando el paquete estadístico OriginPro Versión 8.0

## VII Resultados y Discusiones

### 7.1 Extractos obtenidos

Se obtuvieron dos tipos de extractos como se observa en la figura 19, los cuales presentan de inicio una diferencia visual en la tonalidad de su color ambos extractos tuvieron una concentración de 1g /1mL.

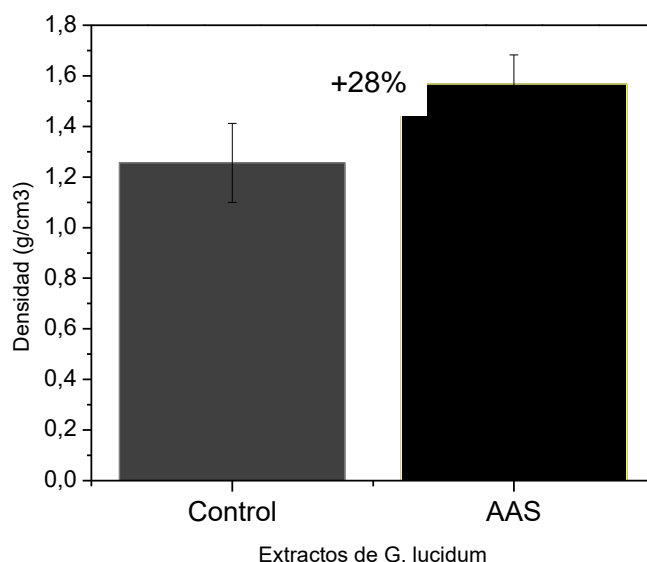


**Figura 19.** Extractos obtenidos del hongo *G. lucidum* a la derecha el extracto adicionado (cultivo con AAS) y a la izquierda el extracto testigo (cultivo tradicional).

### 7.2 Densidad de los extractos

Como se observa en la figura 20, el comparativo de las densidades por gravimetría es posible identificar una apariencia física. Los valores obtenidos de densidad fueron  $1.256\text{g/cm}^3 \pm 0.125$  en el extracto control y  $1.568\text{ g/cm}^3 \pm 0.115$  en el extracto adicionado con AAS. Siendo mayor en el extracto adicionado en un 28% al extracto control, lo que nos demostró que presenta mayor cantidad de compuestos.

Este parámetro se eligió un indicador, por su rápida medición, económica y sencillez como técnica analítica para evaluar la diferencia que se detectó a simple vista entre los extractos, brinda información básica que nos permite evidenciar una diferencia significativa a una  $p < 0.005$ .



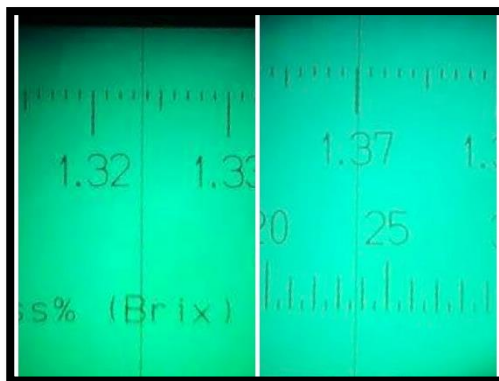
**Figura 20.** Densidad de los extractos testigo y adicionado con AAS.

### 7.3 Índice de refracción

Los resultados obtenidos muestran un índice de refracción de  $1.323 \pm 0.0021$  y  $1.370 \pm 0.0015$  a  $24.8^\circ\text{C}$  tanto en el extracto de basidiocarpos control como en el extracto de basidiocarpos adicionado, respectivamente.

Aun cuando el valor del índice de refracción es ligeramente mayor en el extracto adicionado con AAS que valor del extracto control, no presenta una diferencia significativa, aun cuando es un parámetro sencillo, la concentración de azúcares presentes da resultado similar y no nos permite apreciar la diferencia de contenidos.

Al igual que la densidad es una técnica rápida que requiere poca muestra, no necesita de solventes adicionales, se puede recuperar la muestra, el equipo es sencillo y dentro de los más usados en la industria para el control en procesos de azúcares, vinos, farmacéutica, etc. Sin embargo, el índice de refracción no presenta la sensibilidad adecuada para detectar una diferencia significativa, lo cual lo descarta como parámetro control para diferenciar los extractos adicionados con AAS de los que no (Figura 21).

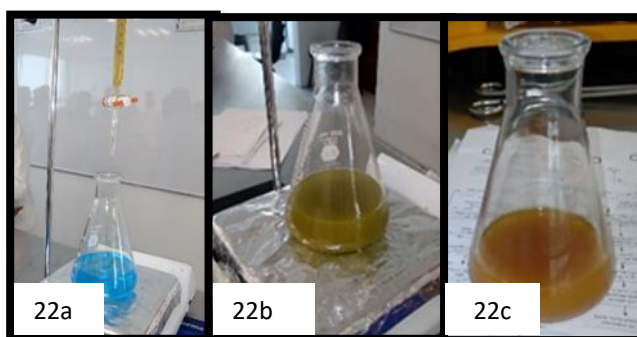


**Figura 21.** Lecturas de índice de refracción, a la izquierda el resultado del extracto control a la derecha la lectura del extracto adicionado con AAS.

#### 7.4 Azúcares reductores por el método de Fehling

Los azúcares reductores presentes en los extractos son importantes debido a que son compuestos cuya funcionalidad ha sido reportada por la presencia de polisacáridos que constituyen a *G. lucidum* por lo que detectarlos en un componente las funciones que se detectan adecuadamente.

Las sales de cobre son ampliamente usadas para mezclas de fracciones de polisacáridos, la solución de Fehling contiene cobre II, iones metálicos, los cuales permiten la formación de complejos por los grupos reactivos OH y NH<sub>2</sub> (Ruthes *et al.*, 2015). La figura 22 muestra los cambios de color conforme se desarrolla la técnica de Fehling.



**Figura 22.** Determinación de azúcares reductores por la técnica de Fehling. La figura 22a es el reactivo inicial de Fehling, se mantiene en agitación y temperatura constante, la figura 22b se torna café rojizo por la adición del segundo reactivo se continua con la adición de la muestra que está en la bureta y genera un precipitado rojo, 22c el punto de viere al adicionar la muestra.

Los azúcares reductores detectados presentaron valores de  $8.784 \pm 2.019\%$  en el extracto de basidiocarpos control y  $41.326 \pm 1.430\%$  en el extracto de basidiocarpos adicionado con AAS los datos obtenidos se presentan en la tabla 3. Esto representó un incremento en la concentración de 4.7 veces más en el extracto adicionado con AAS, es una técnica que no realiza discriminación de compuestos ya que se detecta la totalidad de azúcares reductores presentes.

**Tabla 3.** Valores obtenidos en el análisis de los extractos para azúcares reductores.

Número de Muestras	mL gastados	Factor Fehling	Muestra	Vol. De aforo (mL)	% azúcares reductores
AAS	3	0,012	1	100	40,000
AAS	2,7	0,012	1	100	41,326
AAS	2,8	0,012	1	100	42,857
T1	15,5	0,012	1	100	7,742
T2	16	0,012	1	100	7,500
T3	10,8	0,012	1	100	11,111

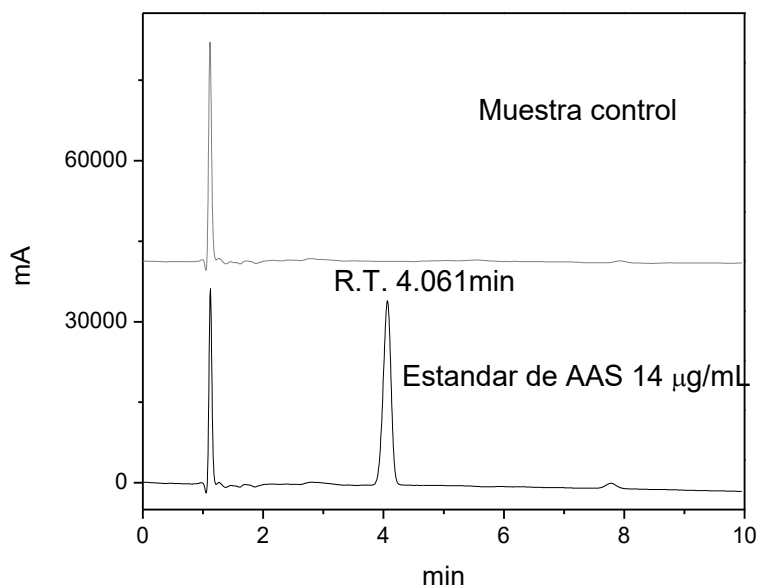
Los resultados fueron significativamente diferentes a una  $p < 0.005$  lo cual nos indica una diferencia significativa entre los extractos control y el extracto adicionado con AAS.

Los tratamientos con la solución de Fehling no son muy comunes cuando se hace la purificación de los D-glucanos, pero en caso de que se encuentren homopolímeros remanentes principalmente en las extracciones acuosas que encontramos fracciones solubles podemos detectarlos con esta técnica (Ruthes *et al.*, 2015).

### 7.5. Cuantificación de ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La detección del AAS se inició con la validación del método, se determinó tiempo de retención (Figura 23), usando una curva de calibración de 2.65 a 63.6  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 24), la precisión del método evaluada por la repetibilidad a una concentración de 40  $\mu\text{g/mL}$  teniendo un promedio de siete determinaciones de  $41.471 \pm 0.837 \mu\text{g/mL}$ , un coeficiente de variación de 2.02  $\mu\text{g/mL}$  y un porcentaje de recuperación en exactitud de 97.808%, valor que coincide con lo reportado en la determinación de este parámetro en alimentos que fueron adicionados (Venema, *et al.*, 1996) de 95-98% para ácido acetilsalicílico, con un límite de detección de 0.02 mg/kg para alimentos frescos y 0.2 mg / kg para alimentos secos para todas las sustancias.

El tiempo de detección se estableció en el minuto 4.061 con una ventana del 5%. La cuantificación se realizó a través de la curva de calibración por estándar externo (Figura 24).

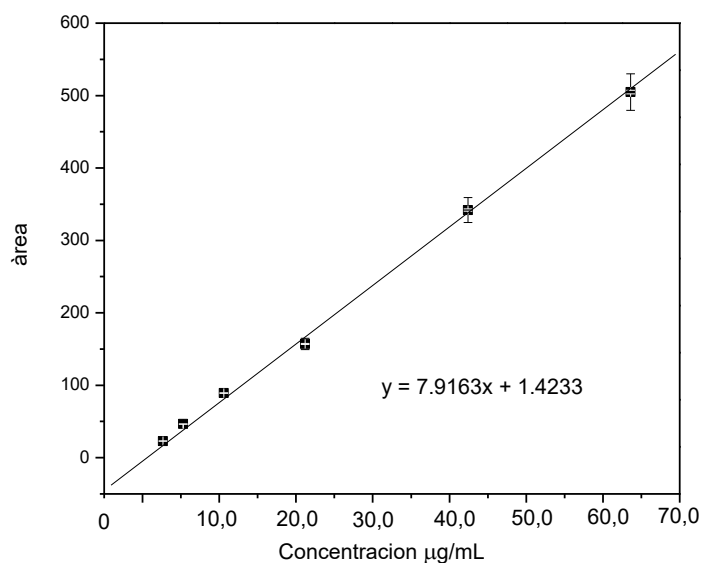


**Figura 23.** Tiempo de retención del ácido acetilsalicílico por HPLC.



La linealidad obtenida arrojó un coeficiente de correlación de 0.9994, una pendiente de 7.916 y una intercepción de 1.42, con la cual se hizo la cuantificación de ácido acetilsalicílico. El valor determinado de AAS promedio fue de  $8.828 \pm 2.13\mu\text{g/mL}$  (0.049mM) presente en el extracto fresco obtenido de los basidiocarpos adicionados, como se puede observar en la figura 26, esto representa el 0.49% de lo adicionado al substrato.

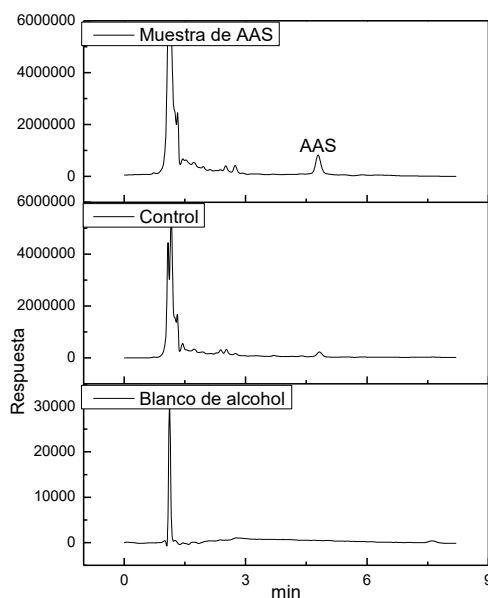
Esto sugiere que parte del ácido acetilsalicílico adicionado bajo condiciones axénicas y controladas durante el cultivo se fue translocando al micelio, esto debido a la propiedad característica de los hongos al ser osmótrofos dado que su nutrición es por absorción osmótica y difusión a través de las membranas plasmáticas de las hifas (Meneses *et al.*, 2016).



**Figura 24.** Curva de calibración de ácido acetilsalicílico.

Se encontró una baja concentración de AAS en los extractos, lo que indica que este compuesto ha sido usado en alguna de sus fracciones o en su totalidad en el metabolismo de *G. lucidum*. Esto puede promover la presencia de una mayor concentración de compuestos característicos presentes en este hongo, permitiendo con esto el incremento de los beneficios que ofrece, considerando que no hay un



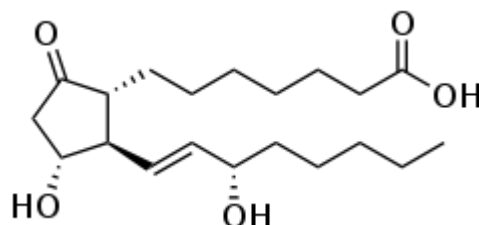


**Figura 26.** Presencia de ácido acetilsalicílico en la muestra cuyo sustrato estuvo adicionado con AAS determinado por HPLC.

El ácido acetilsalicílico es una fitohormona común en algunas hortalizas, su presencia ha sido relacionada con la de inhibición de la biosíntesis de prostanoideos y disminuir los sitios activos para la serina y del ácido araquidónico por la vía de acetilación de la cicloxigenasa-1 y 2(COX-1 y COX-2). Los prostanoideos son una familia de sustancias biológicamente activas que derivan de ácidos grasos eicosanoides. Los tres grupos principales de prostanoideos son las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Todos ellos mediadores en numerosos procesos fisiopatológicos, entre ellos en la respuesta inmune inflamatoria, agregación plaquetaria, vasoconstricción, vasodilatación, motilidad gastrointestinal y actividad neuronal (Prince *et al.*, 1981).

Las prostaglandinas realizan tanto funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos como con el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias (García y Gómez-Reino, 2000), se han reportado valores detectados de ácido acetilsalicílico entre 0.008 a 0.23mg/kg en hierbas secas debido a que antes de la desecación se incrementa la producción de este compuesto, la presencia de este compuesto en diversas plantas, lo que indica que es común encontrar estos valores

sin generar una respuesta negativa en los consumidores (Scotter *et al.*, 2007). La Universidad de Wageningen también ha señalado, que los tomates, las moras y las frambuesas tienen más de 1 miligramo de ácido salicílico por cada 100 g (Venemab *et al.*, 1996).

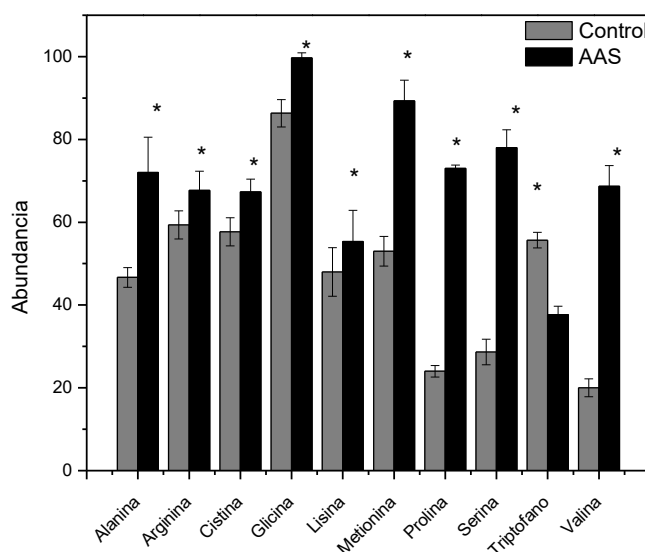


**Figura 27.** Estructura de una prostaglandina E1 (PGE1). importante como mediadora de diversas funciones sustancias de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides), que contienen un anillo ciclopentano y constituyen una familia de mediadores celulares (Prince *et al.*, 1981)

## 7.6 Identificación de compuestos detectados por resonancia magnética radio-iónica (MARSIII)

Los extractos fueron sometidos en el Analizador Cuántico de Resonancia Magnética M.A.R.S.III de Bruce Copen, esta técnica tiene como fundamento, la capacidad hacer interacción de la corriente eléctrica con los materiales que pueden conducir electricidad, con una corriente del equipo y con ello tener una respuesta de acuerdo con su composición, la potencia de la corriente que se transmitió sobre las muestras está a una frecuencia de 6 Hz. es una técnica que se propone en áreas de clínicos, fitoquímica y suelos por lo que se experimentó con el ensayo de las muestras de extracto de *G. lucidum*.

Se escanearon diversos compuestos dentro de la plantilla que indica el equipo, teniendo como atractivo que no hay manipulación de la muestra, es rápida, económica, aunque tiene la limitante que es cualitativa, se determinaron aminoácidos (Figura 28), ácidos orgánicos (Figura 29), enzimas, carbohidratos, grasas y proteínas (Figura 30), todos ellos reportados en proporción de comparación del extracto control con el extracto adicionados con AAS.



**Figura 28.** Perfil de Aminoácidos encontrados por resonancia magnética radio-iónica. (\*) indica  $p < 0.05$  en comparación con el control y muestra AAS usando ANOVA de una vía.

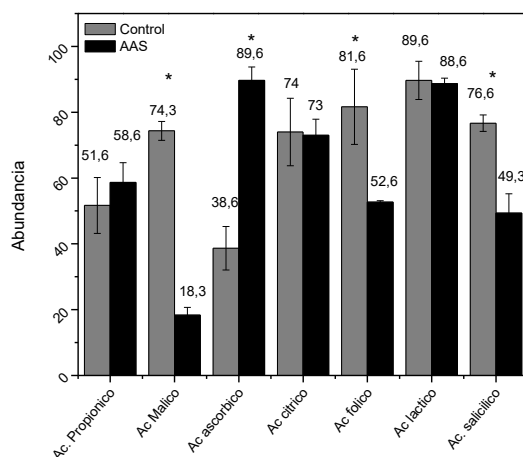
La figura 28 muestra un incremento de la presencia de aminoácidos detectados en el extracto donde el cultivo de basidiocarpos fue adicionado con AAS como es el caso de la alanina, arginina, cistina, glicina, lisina, metionina, prolina, serina y valina. Por otro lado, el triptófano fue el único aminoácido donde el extracto control presenta una mayor concentración en comparación con el extracto adicionado con AAS.

Este aminoácido presenta una cadena lateral con un grupo indol, es uno de los 20 aminoácidos esenciales y promueve la liberación del neurotransmisor serotonina, involucrado en la regulación de sueño y placer, también es un aminoácido precursor de diversos metabolitos secundarios tales como alcaloides, pigmentos y hormonas, existen algunos estudios donde se reporta el contenido de compuestos indólicos donde los aminoácidos como la serotonina, L-triptófano y 5-hidroxi-L-triptófano, en hongos como la *Armillaria mellea* son usados en los tratamientos del estado del ánimo y depresión ( Muszyńska *et al.*, 2015; Kala *et al.*, 2017).

La presencia de aminoácidos en los extractos favorece la formación de proteínas tipo FIP que se presenta en una de secuencia donde principalmente se encuentran secuencias de aminoácidos, aminoglucósidos, así como la formación de

proteoglicanos que son glúcidos y péptidos en una relación 11:5.1 que promueven la producción de linfocitos (Ríos-Cañavate, 2008; Taofiq *et al.*, 2017).

La proteína inmunomoduladora fúngica (FIP) es un componente bioactivo ya documentado aislado como un tercer componente después de los compuestos de polisacáridos y triterpenos (Cong *et al.*, 2014). Esta proteína está formada por un familia de proteínas LZ-8 (FIP-glu), FIP-gts, FIP-fve, FIP-vvo, FIP-gja, FIP-gmi, FIP-gsi y FIP-tvc, todas ellas forman la proteína FIP, solo cinco FIP: LZ-8 (FIP-glu), FIPgts, FIP-fve, FIP-vvo y FIP-tvc, han sido aislados directamente de los micelios de los hongos naturales, de ella se ha identificado una secuencia de 10 aminoácidos responsables de inducir la actividad inmunomoduladora, se identificaron a partir de *G. lucidum*, *G. tsugae*, *Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea*, *G. japonicum*, *G. microsporum*, *G. sinensis* y *Trametes versicolor* (Li *et al.* 2012; Cong *et al.*, 2014).



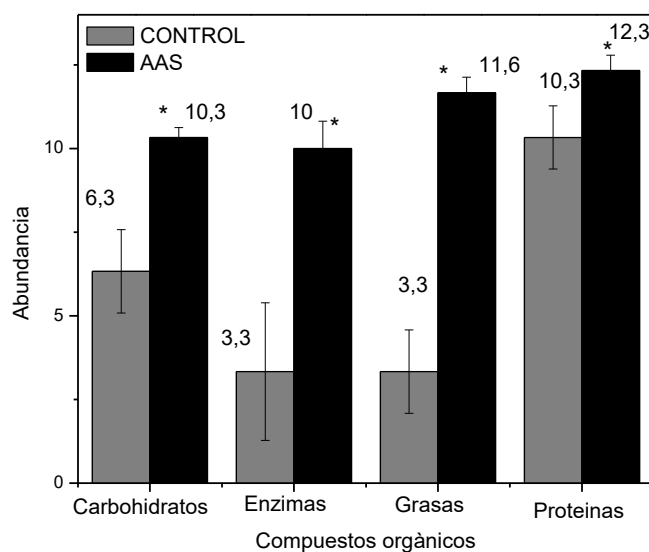
**Figura 29.** Gráfico comparativo de ácidos orgánicos presente en los extractos, con (\*) indica  $p < 0.05$  en comparación con el control y muestra AAS usando ANOVA de una vía.

Podemos ver en la figura 29 que algunos ácidos se encuentran en mayor proporción en el extracto control, como es el ácido málico, cítrico, fólico, láctico y salicílico y algunos otros ácidos se encuentran en mayor proporción en el extracto adicionado con AAS siendo estos el ácido propiónico y ácido ascórbico.

La presencia de ácidos orgánicos en los extractos es importante, su presencia puede deberse a ser el resultado del fraccionamiento de los ácidos ganodéricos y estas fracciones se estén oxidando hasta un radical carbonilo o bien que sean parte de la

composición de los metabolitos de *G. lucidum*, en cualquier caso, el que se encuentren los extractos puede ser favorables para el incremento de plaquetas cuando se incrementa la concentración. En el caso que estos ácidos sean reducidos, esto incrementa la presencia de alcoholes esto incrementan los efectos antitumorales, lo cual está relacionado con la citotoxicidad directa de los triterpenoides frente a células tumorales aun cuando esto no ha sido demostrado un mecanismo (Lin, 2005; Ríos-Cañavate 2008).

En un barrido general realizado a los extractos donde se monitorearon los carbohidratos totales, enzimas, contenido de grasas y proteínas por este método se obtuvo el siguiente resultado que se muestra en la figura 30.



**Figura 30.** Detección de compuestos orgánicos por resonancia magnética radio-iónica. (\*) indica  $p < 0.05$  en comparación con el control y muestra AAS usando ANOVA de una vía.

En general podemos observar que la presencia de carbohidratos es mayor en el extracto de basidiocarpos adicionado con AAS, lo que representa un 38.71% más que el control.

Las enzimas presentan un incremento del 66.67%, las grasas totales un incremento de 71.43% y las proteínas con un 16.22% mayor, estos resultados van acorde a lo reportado por Chistyachenko *et al.*, (2015), quienes reportaron un

incremento de azúcares como el polisacárido arabino-galactano con actividad antitrombótico, así como los compuestos de naturaleza proteínica son mayores en el extracto control en un 29.63% comparado con el extracto de basidiocarpos enriquecidos.

Existen estudios donde se compara la digestión sin y con hongos comestibles incluidos en la dieta y se ha visto una mejor digestión con hongos comestibles por el aporte de los nutrientes como carbohidratos, aminoácidos, proteínas y minerales, así también por las sustancias que en contacto con los jugos digestivos se activan. Como la liberación de compuestos fisiológicamente activos de cuerpos fructíferos de hongos comestibles, se ha demostrado que son valiosos para una adecuada dieta, a través de la simulación de las condiciones existentes en el tracto digestivo humano, teniendo como resultado un entorno para estudiar la liberación de estos componentes que promueven la salud. También se ha demostrado que componentes de los hongos comestibles no solo acumulan y sintetizan compuestos particulares y bioelementos de importancia médica, sino que también favorecen la eliminación de moléculas tóxicas en el tracto digestivo (Kala *et al.*, 2017).

La técnica de resonancia magnética iónica demostró ser una técnica de detección rápida para productos naturales biológicamente activos que puedan tener influencia o un papel estratégico en la investigación fitoquímica y ahora micoquímica, a través de extractos crudos o de sus productos para conocer el valor nutricional y funcional dando una respuesta en abundancia relativa de la composición de compuestos presentes que si se aplica con estándares podría ser una técnica de cuantificación.

El detectar la presencia de estos compuestos en mayor proporción en el extracto adicionado, indica que la adición de AAS juega un papel importante en el metabolismo de *G. lucidum*, ya sea como AAS o bien como el producto de su descomposición, como ácido salicílico. Es importante indicar que las mediciones realizadas bajo esta técnica son más dispersas que en otras técnicas como se verá más adelante.

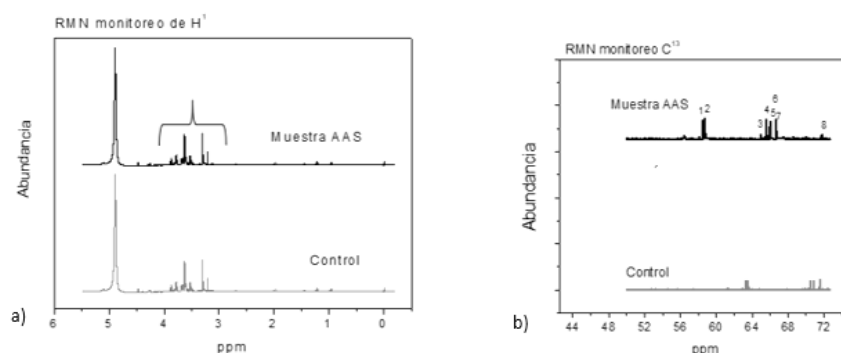


## 7.7 Determinación de perfiles por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La técnica de RMN es una herramienta usada en el análisis de carbohidratos, a través de obtener perfiles de comparación de los átomos de hidrogeno y átomos de carbono que conforman las moléculas que estén presentes, ya que nos permite determinar el tipo y posición de los enlaces que conforman las moléculas, así como sus proporciones, es decir las conformaciones  $\gamma$  y  $\beta$  a través de constantes, esto es posible porque el espectro obtenido es una huella espectral de una molécula. La debilidad de la técnica es la necesidad de solventes deuterado, interferencias en la presencia de mezclas de carbohidratos, la muestra debe tener una alta solubilidad y la necesidad de usar estándares.

Esta técnica se empleó para obtener perfiles de ( $^1\text{H}$ ) y ( $^{13}\text{C}$ ) presentes en la muestra de los extractos, no se contó con marcadores deuterado por lo que los perfiles obtenidos se compararon con reportados en la caracterización de  $\beta$ -1,3-glucano de Roy *et al*, (2009) y Kao *et al.*, (2012).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 31, se observó que ambos extractos presentaron una composición similar, siendo la diferencia una mayor proporción en el perfil del extracto de muestra adicionada con AAS, sin mostrar evidencia de alguna señal que nos diera más información de la presencia de compuestos diferentes a los carbohidratos que se monitorearon con AA  $^1\text{H}$ , en el caso de monitoreo de  $^{13}\text{C}$ .

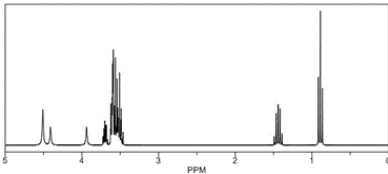
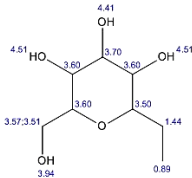
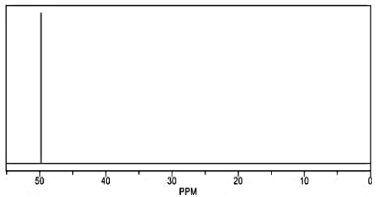
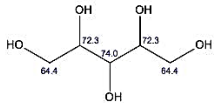
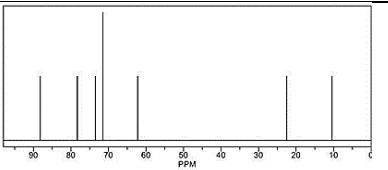



**Figura 31.** Comparación de los perfiles de muestras por RMN, figura 31a monitoreo de hidrógeno deuterado y figura 31b monitoreo de  $^{13}\text{C}$  deuterado para ambos extractos medidos a  $27^\circ\text{C}$ .



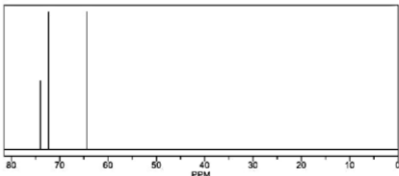
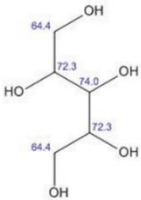
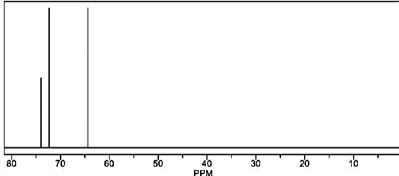
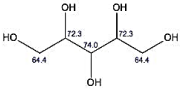
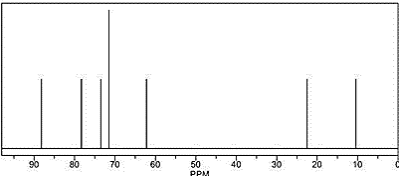
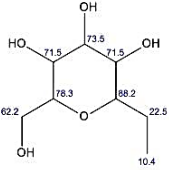
Por otra parte, en la tabla 4 se muestran las señales anoméricas obtenidas de análisis que se compararon con el perfil de la biblioteca interna. Nos dió información de una posible molécula, este nos dice que existe una probabilidad arriba del 60% que la molécula encontrada corresponde a:  $\beta$ -glucopiranosido, ribitol y metanol con el perfil de H y con el perfil de C, nos propone que se detectan perfiles de: arabinitol,  $\beta$ -glucopiranosido y metil  $\beta$  glucopiranosido.

**Tabla 4.** Relación de enlaces y proporciones de H en ambos extractos por RMN.

Node	Señal en ambos extractos	Id	Enlace presente	Perfil detectado	Sugerencia de Compuesto encontrado
OH	4.70	4.20 1.37 2.20	1 -CC(O) metileno 1 alfa -C		
CH2	3.59	1.37 2.20 9.4	metileno 1 alfa -C beta-C		
CH	4.7	1.0 4.9	2 alfa -C 1 alfa-O		

La RMN es una herramienta muy útil para la determinación de estructuras a partir de desplazamientos y marcadores deuterados sin embargo no logramos determinar con precisión moléculas nuevas que pudieran estar presentes por la adición del AAS, debido a que requiere de otras técnicas complementarias para corroborar la información tales como espectroscopia de correlación filtrada de doble cuántica por sus siglas en inglés (DQF-COSY), espectroscopia de correlación total (TOCSY), Espectroscopia de Efecto Overhauser Nuclear (NOESY), entre otras (Roy *et al.*, 2009), estas técnicas incrementa el costos por lo que es recomendable trabajar

otras técnicas que nos permitan identificaciones más rápidas y accesibles( Ruthes, *et al.*, 2015).

<b>Tabla 5.</b> Relación de enlaces y proporciones para C RMN.						
Node	Señal Ambos extractos	ID	Enlace presente	Perfil detectado	Compuesto encontrado	
CH	74.0	18.2 49.0 18.0	2 alfa -C 1 alfa-O 2 beta-C			
CH	72.3	18.2 49.0 9.4	2 alfa-C 1 alfa-O 1 beta-C			
CH2	64.4	9.1 49.0 9.4	1 alfa -C 1 alfa -O 1 beta -C			
CH	74.0	18.2 49.0 18.8	2 alfa -C 1 alfa-O 2 beta-C			
CH	72.3	18.2 49.0 20.2	2 alfa-C 1 alfa-O 2 beta-O			
CH2	64.4	9.1 49.0 9.4	1 alfa -C 1 alfa -O 1 beta -C			
	78.3	18.2 49.0 20.2	2 alfa -C 1 alfa-O 2 beta-O			
CH	88.2	18.2 49.0 18.8	2 alfa -C 1 alfa-O 2 beta-C			
CH	71.5	18.2 49.0 20.2	2 alfa-C 1 alfa-O 2 beta-O			
CH2	73.5	9.1 49.0 9.4 10.4	1 alfa -C 1 alfa -O 1 beta -O 1 alfa -C			
CH2	22.5	18.2 10.4 9.1	2 alfa-C 1 beta-O 2 beta-O			
CH3	10.4	9.1 9.4	1 alfa-C 1 beta-C			

## 7.8 Identificación de compuestos orgánicos por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM)

### 7.8.1 Compuestos por extracción con cloroformo

Los compuestos orgánicos presentes en los extractos se identificaron por tres métodos: el primero donde se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo para obtener compuestos solubles y por afinidad en su polaridad con el solvente, el segundo método fue usando una derivatización con trimetilsiloxano (TMCS) y el tercero con dimetilsulfoxido (DMSO).

Se obtuvieron una gran cantidad de compuestos por esta técnica como se puede observar en la Tabla 6., sin embargo existieron compuestos exclusivos del extracto control como lo son: 2-metil-4-oxo- ácido pentanoico, etofumesato, 2,4-dimetil-benzo[h]quinoline, 3,5,7-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-1-Benzopiran-4-one, decil, fenil éster ácido Isoftàlico, N,N-di(trifluoroacetil)-2 -Aminofluoreno, 17 - (dimetilamino)- [2] (1,4) Nafaleno [2](2,6) piridinofano.

Así también, algunos compuestos estuvieron presentes únicamente en el extracto con la adición del AAS: alcohol feniletíl, 2-metil-4-oxo-ácido pentanoico, ácido 5-hexenoico 6-[p-clorofenil]-2,4-dioxo- éster etílico, 4-Fenoxi-5,6-difenil-2H-piridazin-3-one, 4-Dehidroxi-N-(4,5-metilenedioxy-2-nitrobenzilidene) tiramina, 3-hidroxi-2-metoxi-O-metiloxim estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3-clorofenil decil éster ácido tereftàlico, 3-clorofenil decil éster ácido tereftàlico, ácido abietico, 2-[2-[2-(4-Cloro-fenoxi)-etilsulfanil]-benzoimidazol-1-yl]-acetamide.

La diferencia de detección de compuestos en ambos análisis pudo obtenerse moléculas que se fraccionan durante el análisis las moléculas y su posterior identificación, siendo esta una desventaja de esta técnica por esta razón se propusieron los análisis con derivatización, donde se protegen las moléculas dándole mayor estabilidad.

**Tabla 6.** Compuestos obtenidos por extracción con cloroformo y analizado por CG-EM

No.	T.R. (min)	Compuestos
1	3.661	3-metil-1-Butanol
2*	10.46	2-metil-4-oxo-ácido pentanoico
3*	10.67	Alcohol feniletil
4*	17.009	2-metil-4-oxo- ácido pentanoico
5	25.506	1,3-dihidro-5,6-dimetil-2-Benzotifeno
6*	17.012	Etofumesato
7	25.603	17-(acetiloxi)-1,2,7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-13-metil-, [4 S-(4. $\alpha$ ,8. $\alpha$ ,9. $\beta$ ,10.al 4,10-(Metanoximetano)-10H-ciclopenta[a]fenantren-3(4H)-one
8*	25.617	2,4-dimetil- Benzo[h]quinoline
9*	26.168	Ácido 5-hexenoico 6- [p-clorofenil] -2,4-dioxo-éster etílico
10	27.766	5-hidroxi-6-(4-metoxifenil)-1,2-dimetil-etil éster Indole-3- ácido carboxílico
11*	28.452	3,5,7-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-1-Benzopiran-4-one
*	28.69	(3. beta.)-Pregn-5-en-3-ol
12*	29.470	decil fenil éster ácido Isoftálico
13 <sup>a</sup>	30.273	6-amino-5-ciano-4-(2,4-difluorofenil)-24H-Piran-3- ácido carboxílico
14*	30.670	4-Fenoxi-5,6-difenil-2H-piridazin-3-one
15*	30.858	N, N-di(trifluoroacetil)-2-Aminofluoreno
16*	31.764	4-Dehidroxi-N-(4,5-metilenedioxy- 2-nitrobenzilidene) tiramina
17*	32.456	3-hidroxi-2-metoxi-O-metiloxim estra-1,3,5(10)-trien-17-one
18 <sup>a</sup>	32.656	4-[3-Piridil]-3-tiosemicarbazone piperonal
19*	32.972	3-clorofenil decil éster ácido tereftálico
20	33.488	5,5'-Di(etoxicarbonil)-3,3'-dimetil-4,4'-dipropil-2,2'-dipirrimet
21	34.347	Lanostane-3,12-dione
22	34.148	Etoxifluorescein etil ester
23*	34.958	17-(dimetilamino)- [2] (1,4) Nafaleno[2](2,6)piridinofane
24*	35.074	Ácido abietico
25*	35.575	2-[2-[2-(4-Cloro-fenoxi)-etilsulfanil]-benzoimidazol-1-yl]-acetamide
26	36.977	5,5'-Di(etoxicarbonil)-3,3'-dimetil-4,4'-dipropil-2,2'-dipirrimetano
27	36.875	3a, 5,6, 6a, 7,9b-hexahidro-6-hidroxi-3,6,9-trimetil- [3S- (3. $\alpha$ , 3a. $\alpha$ , 6. $\alpha$ , 6a. $\alpha$ , 9b $\beta$ -Azuleno [4,5-b] furan-2,8 (3H, 4H)-dion
28	36.977	(3 $\beta$ , 5. $\alpha$ .,6 $\alpha$ )- 5,6-epoxi-Colestan-3-ol,
29*	40.24	ác. yohimbico
30	42.08-45.96	1,2-Benzisothiazol-3-amine tbdms
31*	43.514	4-metil-2-trimetilsililoxi-acetofenone

\* Indica la presencia del compuesto solo en el extracto con adición de AAS

+ Indica la presencia del compuesto solo en el extracto de control.

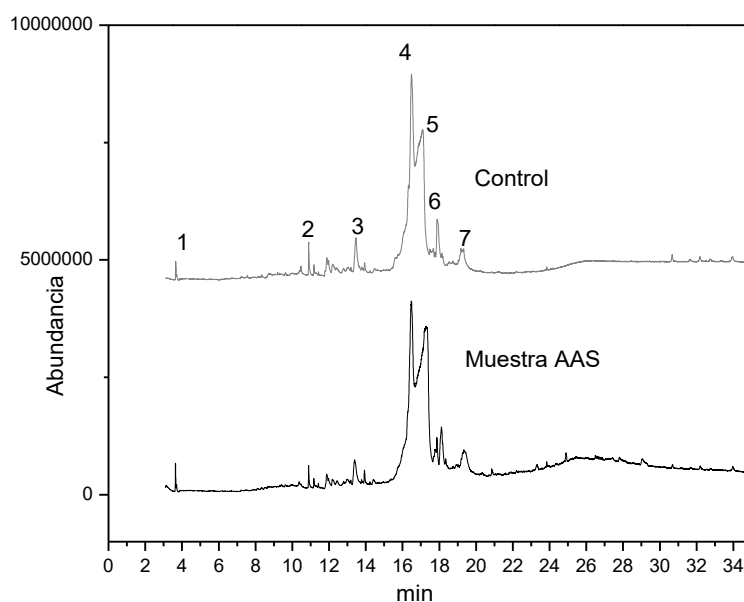
a Compuestos presentes en mayor proporción en forma significativa a una  $p < 0.005$  en el extracto agregado con AAS.

No todos los compuestos se han reportado con aplicación en el área de salud, los más relevantes en esta detección son el ác. yohimbico al 1.47% al 40.24min con actividad tranquilizante e hipotensivo (Diassi y Dylion, 1958), 1,2-Benzisothiazol-3-amine tbdms al 10.44% en los tiempos de retención 42.08,42.86, 45.38 y 45.96min; el (3.beta.)-Pregn-5-en-3-ol, al 21.9% en el minuto 28.69 y 43.514 y el 4-metil-2-trimetilsililoxi-acetofenone cuya actividad es antiListerial (Erickson y Nes, 1982).

### 7.8.2 Compuestos por derivatización con trimetilclorosilano (TMCS)

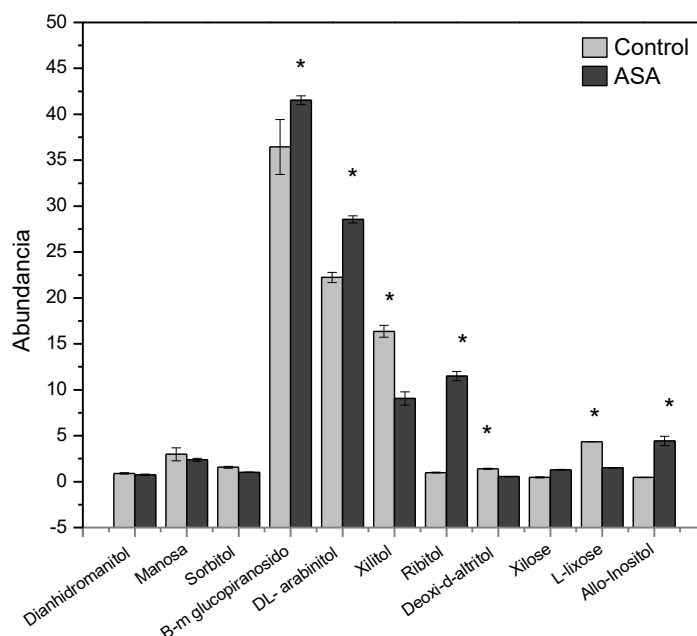
Esta técnica permite una mayor detección de azúcares, los resultados obtenidos demuestran que la adición de AAS en el sustrato promovió la presencia de mayor porcentaje de compuestos siendo este de  $86.5 \pm 1.5\%$ , mientras que en el extracto control fue de  $77.5\% \pm 0.5\%$  de compuestos detectados.

Son siete las áreas de mayor abundancia, siendo esto indicativo de una mayor presencia de azúcares, identificados como picos como se observa en la figura 33.



**Figura 33.** Perfil cromatográfico para la determinación de azúcares por CG-EM.

Los estudios con derivatización se recomienda para la detección de polisacáridos por CG, como se puede observar en la figura 34 el compuesto con la concentración más alta es  $\beta$ -glucopiranosido metil (pico 4) junto con este encontramos otros polisacáridos y polialcoholes confirmando la composición esperada característica de *G. lucidum* (Tabla 6).



**Figura 34.** Azúcares y polialcoholes determinados por GC-EM en el extracto control y extracto de muestra adicionado AAS. (\*) indica  $p < 0.05$  en comparación, usando ANOVA de una vía.

La naturaleza del extracto tiene como principal composición los polisacáridos entre los que destacan: dihidromanitol, manosa, sorbitol, glucopiranososa, DL-arabinitol, xilitol, ribitol, deoxi-D-altritol, L-lixosa, Allo-inositol, como se puede observar en la figura 34, donde se comparan los resultados obtenidos en el extracto control y el extracto adicionado con AAS.



Los triterpenoides y polisacáridos son los principales productos biofarmacéuticos presentes en *G. lucidum* (Liu *et al.*, 2012). Los polisacáridos encontrados son compuestos de gran importancia, debido a la abundancia en los extractos, el incremento de estos por ende aumenta sus propiedades benéficas.

Se ha reportado que la actividad de los polisacáridos y polialcoholes poseen actividad antioxidante (Synytsya y Novak, 2013; Sun *et al.*, 2004)).

**Tabla 7.** Detección de los compuestos más abundantes por extracción con cloroformo por GC-EM.

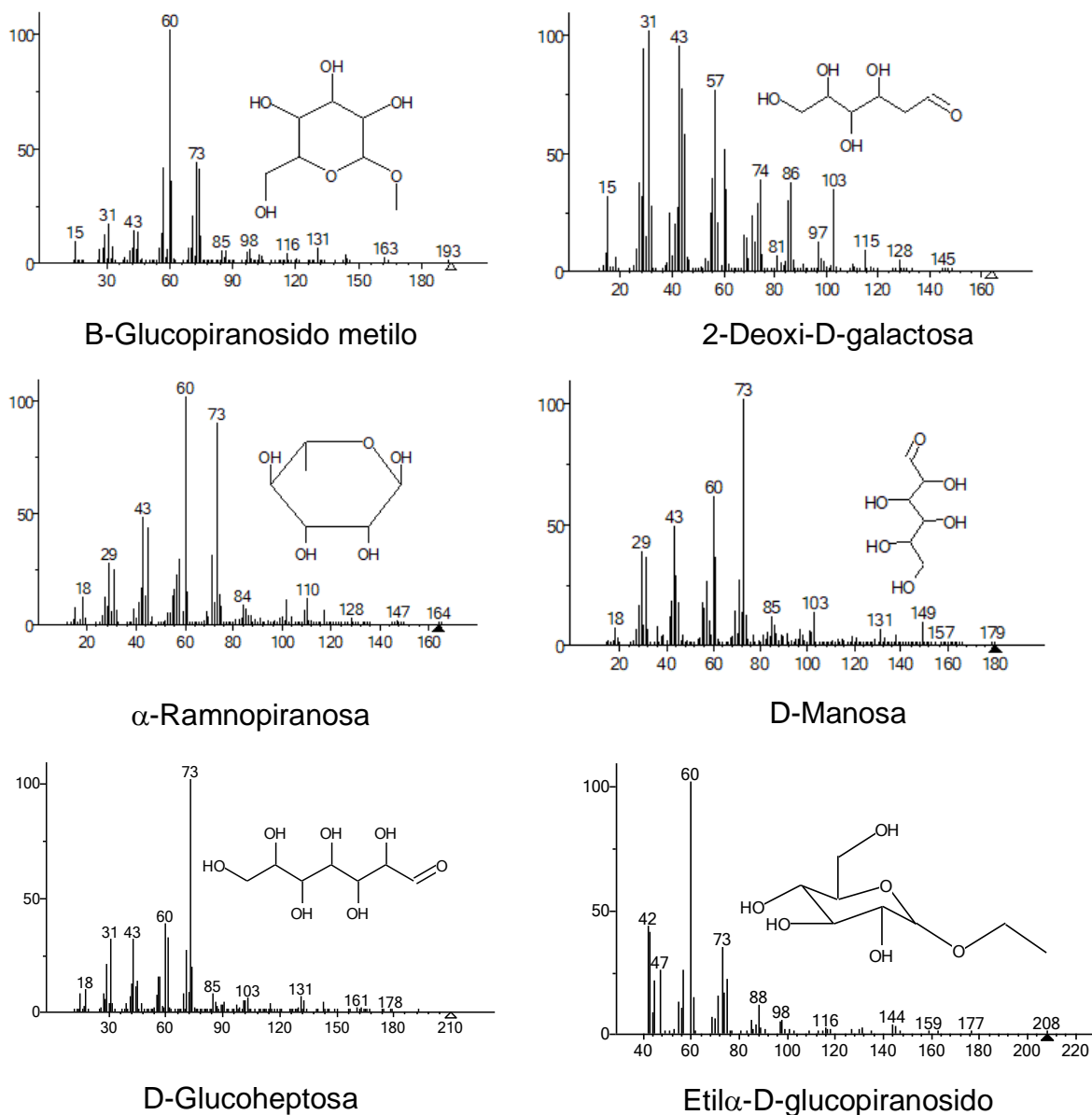
Pico	T.R. (min)	Compuestos	Control (%)	Muestra AAS (%)
1	3.664	3-metil-1-butanol	0.366±0.055	0.749±0.055*
2	10.896	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-one	0.89 ±0.129	2.380±0.583*
3	13.468	Ácido propanoico	1.012±0.010	3.468±0.082*
4	16.341	Galactitol	12.23±2.442	41.537±0.396*
5	16.494	B-D-glucopiranosido metilo	24.557±0.319	31.58±0.461*
6	16.726	Xylitol	9.054±0.585	11.98±0.461*
7	17.095	D-Arabinitol	11.500±0.413	11.38±0.031

(\*) indica  $p < 0.05$  en comparación con el testigo y la muestra de AAS usando ANOVA de una vía.

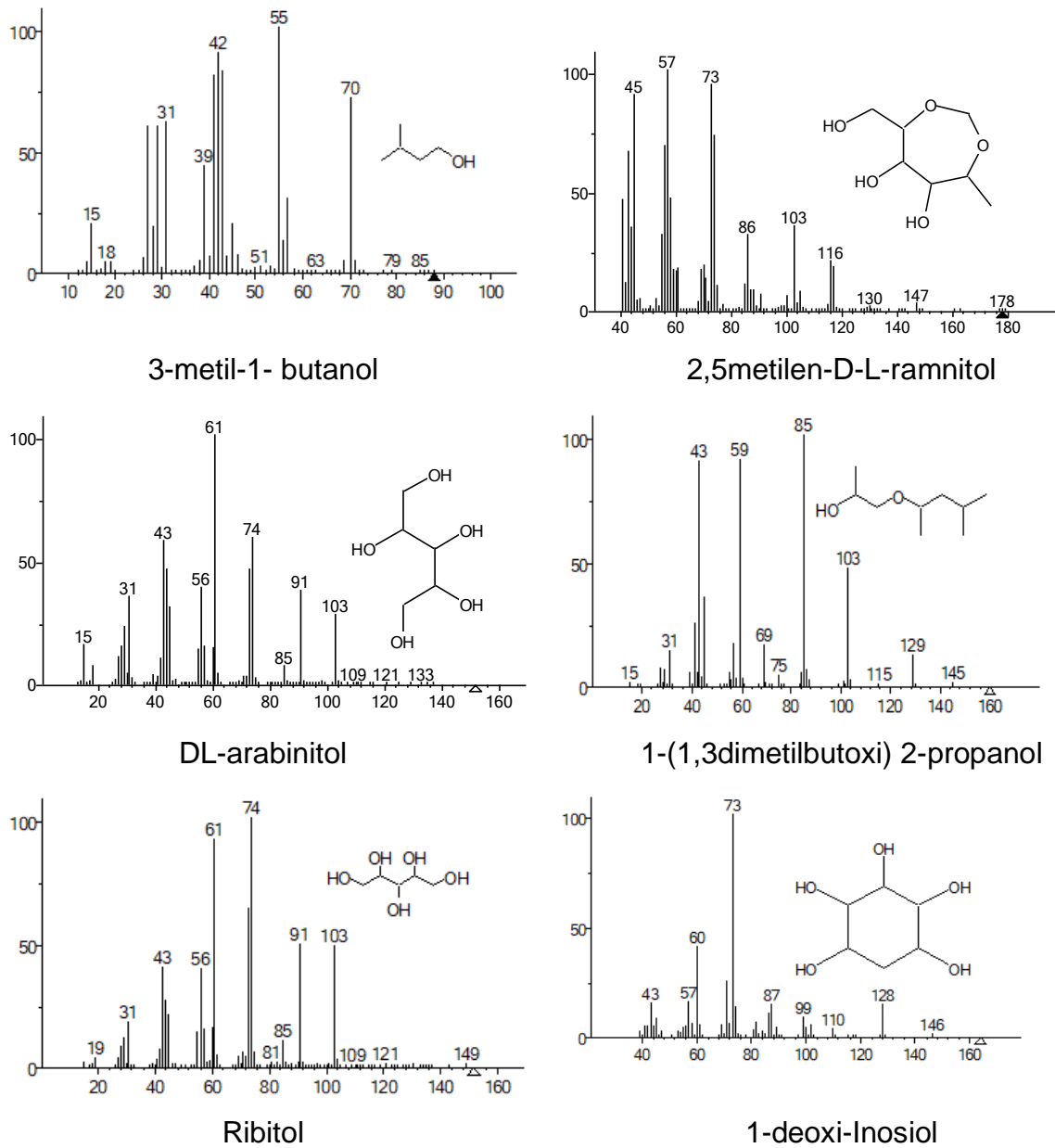
Los D-Glucanos de hongos comestibles presentan estructuras químicas diversificadas siendo el tipo más común el que presenta un esqueleto de  $\beta$ -D-glucosa (1  $\rightarrow$  3) enlazado con frecuencia, ramificado en O-6 por residuos de  $\beta$ -D-glucosa como cadenas laterales. Sin embargo, no siempre es posible distinguir los D-glucanos  $\alpha$ ,  $\beta$  y mixtos (Ruthes *et al.*, 2015). Para la identificación se utilizaron los pares de iones fragmentos de monosacáridos por sus masas; en el caso de glucosa su masa fue de  $m/z$  243/248, para xilosa 128/132 y para arabinosa 217/218. Usando las relaciones de intensidad obtenidas de los cromatogramas de iones extraídos por la biblioteca NIST08, se obtuvieron resultados similares al trabajo reportado por Sárossy *et al.*, (2012), quienes derivaron estándares de monosacáridos como arabinosa, glucosa y xilosa, usando análogos marcados con  $^{13}\text{C}$  para la identificación y el análisis cuantitativo, encontraron una excelente separación cromatográfica de los derivados de monosacáridos y la identificación de la configuración anomérica. Otro trabajo similar reportado por Stojkovic *et al.*, (2015) quienes encontraron la presencia de

fructosa, glucosa, manitol, sucrosa y trihalosa en muestras comparativas de *G. lucidum* de diferentes regiones del mundo, donde las muestras de Serbia tuvieron como azúcar más abundante la fructosa, en las muestras de China predominó el manitol, y en el presente trabajo de extractos de muestras de *G. lucidum* mexicano se detectó mayor presencia de manosa como azúcar y como polialcohol se detectó arabinitol.

Los perfiles iónicos de los principales polisacáridos encontrados en ambos extractos se muestran a continuación en la figura 35.



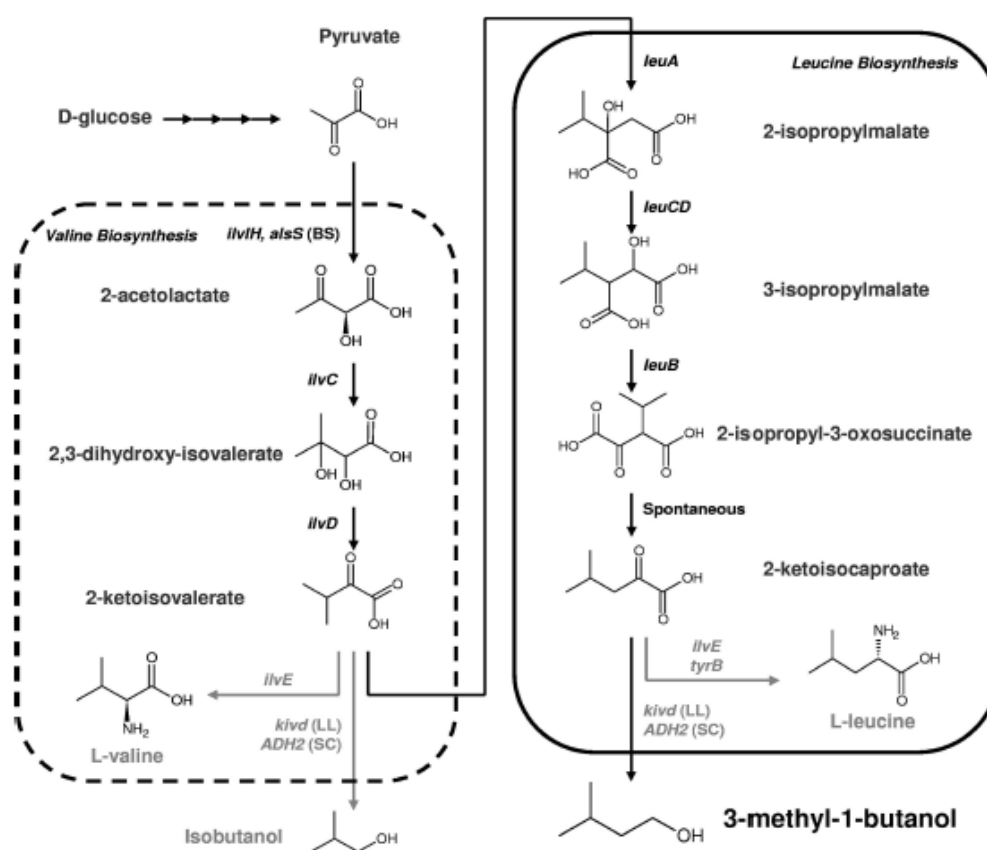
**Figura 35.** Perfiles iónicos de los sacáridos más abundantes de *G. lucidum* mexicano



**Figura 36.** Perfiles iónicos de los polialcoholes más abundantes en el extracto de *G. lucidum* mexicano.

Por otra parte, también se encontraron isómeros de pentanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol que aunque su importancia no está relacionada a la salud, son de

importancias comercial debido a su potencial en el área de biocombustibles, por lo que se han realizado estudios para una producción microbiana sostenible de estos compuestos, con *Corynebacterium glutamicum* y *Escherichia coli* que se han diseñado genéticamente para producir 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol a través de la vía de Ehrlich a partir del 2-ceto-3-metilvalerato y 2-cetoisocaproato, respectivamente (Vogt *et al.*, 2016; Cann y Liao, 2008), lo que implicaría un campo de oportunidad en el incremento de la producción de este compuesto en el área de combustibles.



**Figura 37.** Vía metabólica de la glucosa a 3-metil-1-butanol, por *E. coli*, *B. subtilis*, entre otras. (Connor *et al.*, 2010).

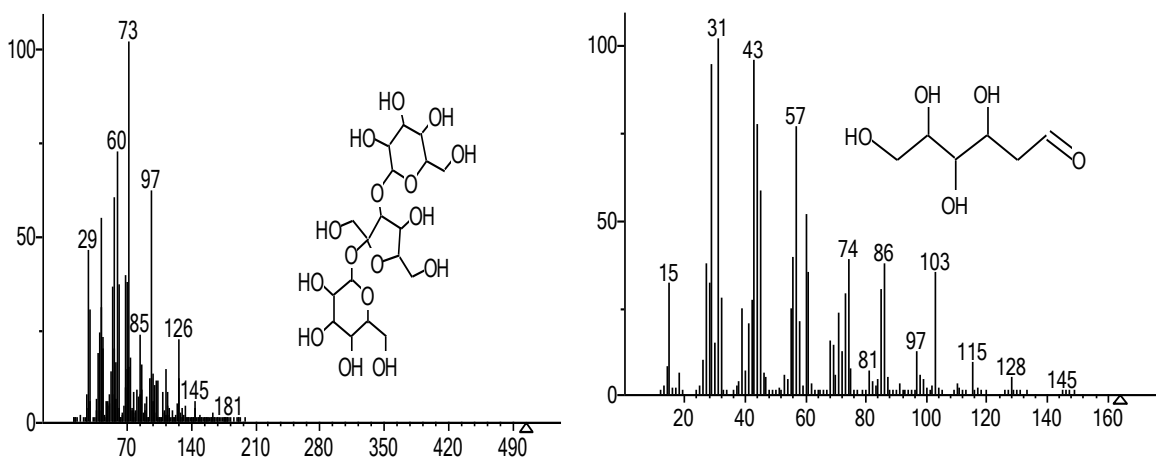
Las detecciones de los siguientes compuestos son comunes en ambos extractos: D-arabinitol, ribitol, manitol,  $\beta$ -D-glucopiranosido, metil-D-ribopiranosido, que son alcoholes y azúcares de cinco átomos de carbono, y una parte integral de la riboflavina (vitamina B2). A estos polisacáridos se le adjudican efectos muy

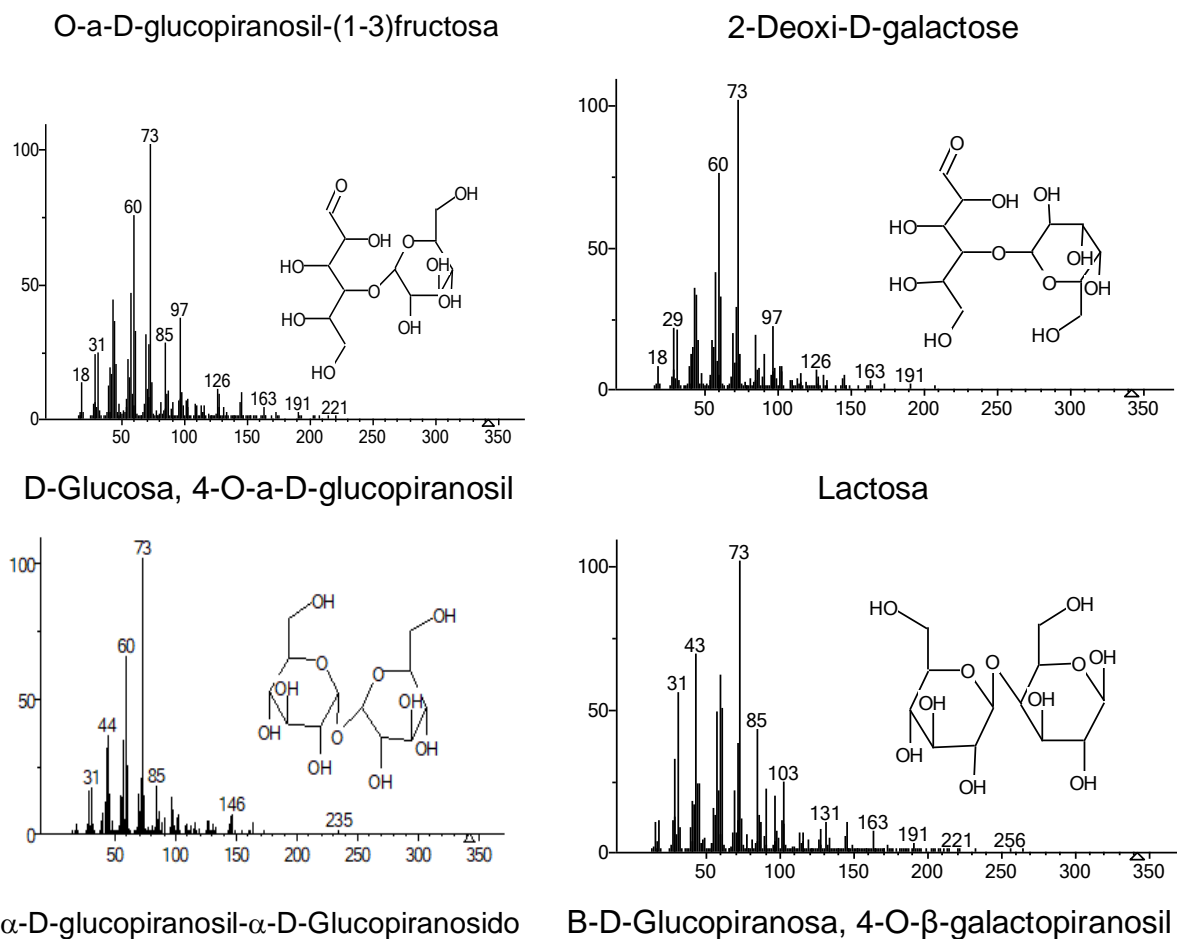
importantes en pacientes con tratamiento de quimioterapia (León-Guzmán *et al.*, 1997; Cao y Lin 2002; Lin 2005), ya que tienen la función de reducir los niveles séricos de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interleucina 6, permitiendo una menor fatiga en el paciente a través de la regulación de las respuestas inflamatorias, el estrés oxidativo y la reducción de la nefrotoxicidad (Ouyang *et al.*, 2016).

Los  $\beta$ -glucano están formados por muchos monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos ya sean homo o hetero polímeros. Existen también en forma lineal, los polisacáridos de hongos pueden tener ramas en que la columna vertebral se uniría a varios carbohidratos o grupos no carbohidratos en diferentes posiciones.

Algunos los polisacáridos de hongos se unen con proteínas o péptidos como un polisacárido-proteína o un polisacárido-péptido, que también se ha demostrado que ejercen una potente actividad biológica. Los  $\beta$ -D-glucanos, heteropolisacáridos y glicoproteínas son comunes y se sabe que los polisacáridos de *G. lucidum* tienen una prometedora inmunomodulación y efectos antitumorales (Cao y Lin, 2002; Lin, 2005). (Figura 38).

Estos polisacáridos no solo podrían activar y promover la maduración de CD cultivadas de médula ósea murina *in vitro*, sino también la iniciación de la respuesta inmune inducida por CD (Cao y Lin, 2002). También podría mejorar la actividad de NK, la actividad fagocítica de neutrófilos aumenta el nivel de interleucina (IL) -1, factor de necrosis tumoral (TNF) - $\alpha$ , y IL-6 producida por macrófagos e interferón (IFN) - $\beta$  por T linfocitos para ejercer sus efectos antitumorales (Cao y Lin, 2002).





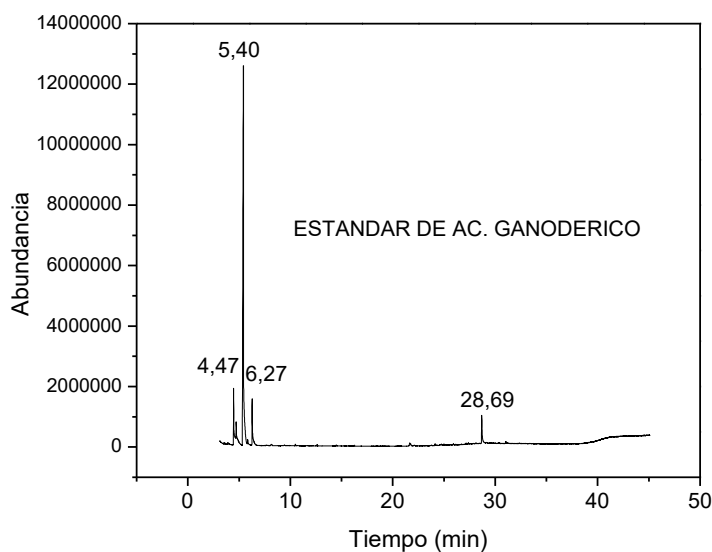
$\alpha$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D-Glucopiranosido      B-D-Glucopiranososa, 4-O- $\beta$ -galactopiranosil

**Figura 38.** Perfiles iónicos de los polisacáridos presentes en ambos extractos de *G. lucidum* mexicano.

Se sabe que los  $\beta$ -glucanos son importantes ya que no son digeribles en el intestino delgado del ser humano debido a que no existen enzimas pancreáticas o intestinales capaces de degradarlas, por lo cual son clasificados como fibra dietética soluble. El efecto fisiológico dependerá del tipo de glucano, dosis, su estructura, peso molecular y el tipo de alimento, en hongos se ha reportado efectos positivos con inclinación a desarrollar una respuesta sobre el sistema inmune, previniendo enfermedades y disminuyendo riesgos de infecciones o cáncer (Pizarro *et al.*, 2014).

Por otra parte, la presencia de los ácidos ganodéricos muy comunes en estos extractos es reportada principalmente por la técnica de HPLC teniendo como principal característica su gran peso molecular, por esta razón es poco usada la técnica de CG.

La mayor desventaja de esta técnica es causar una fragmentación en estos compuestos, por tal motivo se realizó corrimiento con un estándar de ácido ganoderico (C2 (3B, 7B, 15A, 25R3)-7-ácido-15-trihidroxi-11,23dioxo-lanost-8-in-26-oico) para monitorear el comportamiento de fragmentación y extrapolar lo que posiblemente pueda suceder con estos ácidos al determinar compuestos totales y detectar las fracciones posibles por CG-EM (Figura 39).

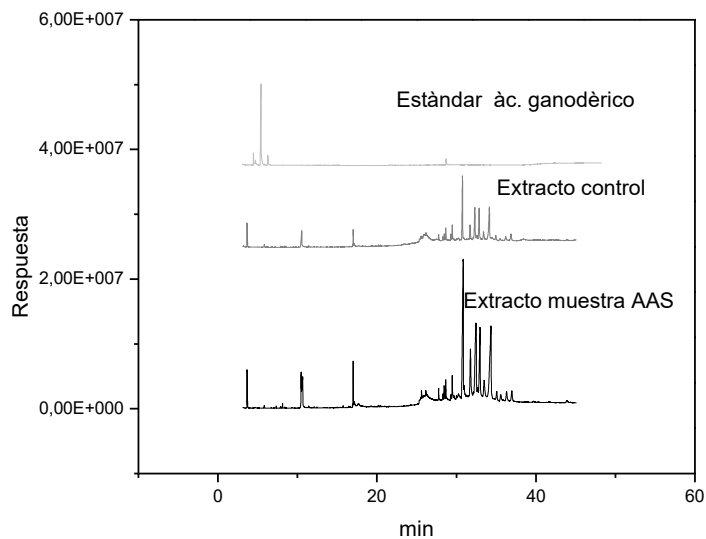


**Figure 39.** Estándar de ácido ganoderico analizado por CG-EM.

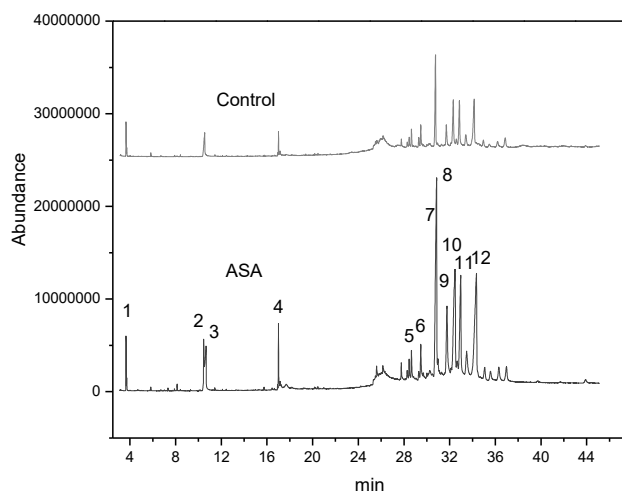
Se observa en la figura 39 las principales fracciones características de la fragmentación al analizar el ácido ganoderico por GC-EM, se encontró en el tiempo 4.47 min 4-metil-3-penten-2-ona, 5.40 min el 4-hidroxi-4-metil 2 pentanona, 6.27 min estireno y en 28.69 min el (3beta)-Pregn-5-en-3-ol, por lo que podemos esperar este fraccionamiento de este ácidos ganodericos, pueda presentarse en los demás extractos. El (3beta)-Pregn-5-en-3-ol se identifica como un esteroide dietético el cual es uno de los principales responsables de la disminución de niveles de colesterol (Erickson y Nest,1982).

Al comparar el cromatograma del estándar de ácido ganoderico, con los cromatogramas de extracto control y extracto adicionado tenemos que el pico al minuto 28.69 del (3beta)-Pregn-5-en-3-ol como una constante en las muestras (Figura

40) estos cromatogramas se hacen por la detección del sobrenadante del extracto también diluido con cloroformo.



**Figura 40.** Comparación de estándar de ácido ganoderico por CG-EM con los extractos.



**Figura 41.** Comparación de compuestos detectados por CG-EM en extracto control y extracto adicionado con AAS.



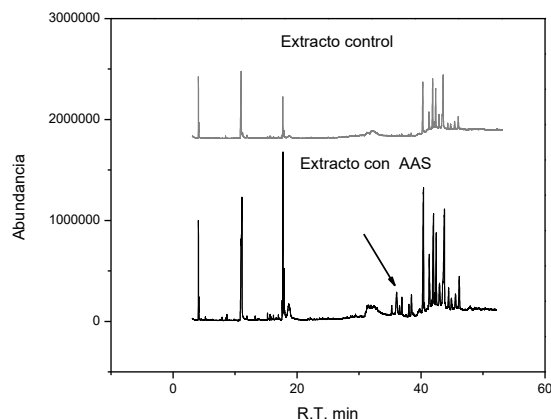
En la figura 41 observamos los principales compuestos presentes en el extracto control y extracto adicionado con AAS representado en picos enumerados del 1-12 los cuales se muestran en la tabla no.8.

**Tabla 8.** Compuestos detectados en sobrenadante de extracto en cloroformo.

No. pico	Compuesto	Extracto adicionado con AAS	Extracto control
1	3-metil-1-butanol	2,07±0,067	1,072±0,22
2	Ácido 2-metil-4-oxo-pentanoico	3,80±0,069*	0,6±0,32
3	Alcohol feniletíl	2,80±0,052	1,45±0,12
4	1,3-dihidro-5,6-dimetil-2-benzotiofeno	2,75±0,162	1,35±0,89
5	B-6-bifenil-B-pentametíl ciclopentadienil cromiun	2,35±0,341	1,16±0,63
6	3,5,7, trimetoxi-2-(4metoxifenil)-4H-1-benzopiran-naltrexon	8,10±0,462	6,74±0,28
7	4 fenoxi-5,6-2Hpiridazin-3-one	10,45±0,487*	5,23±0,78
8	4-metilfenildifenil éster ácido fosfórico	30,85±0,140*	25,60±0,62
9	o-metiloxime-3 hydroxi-2metoxi estra-1,3,5(10) trien-17-one	10,59±0,277*	5,20±0,32
10	4-(3piridil)-3-tiosemicarbazonepiperonal	15,05±0,211*	10,50±0,3
11	3,12-dione-Lanostano-3	10,00±0,274*	6,25±1,8
12	Ácido abiético	13,50±0,230*	4,73±0,21

(\*) indica  $p < 0.05$  en comparación con el control y muestra AAS usando ANOVA de una vía.

La figura 42 muestra la zona con mayor contenido de compuestos y está indicada en el rango de 27 al 30 min, con mayor abundancia en el extracto control.



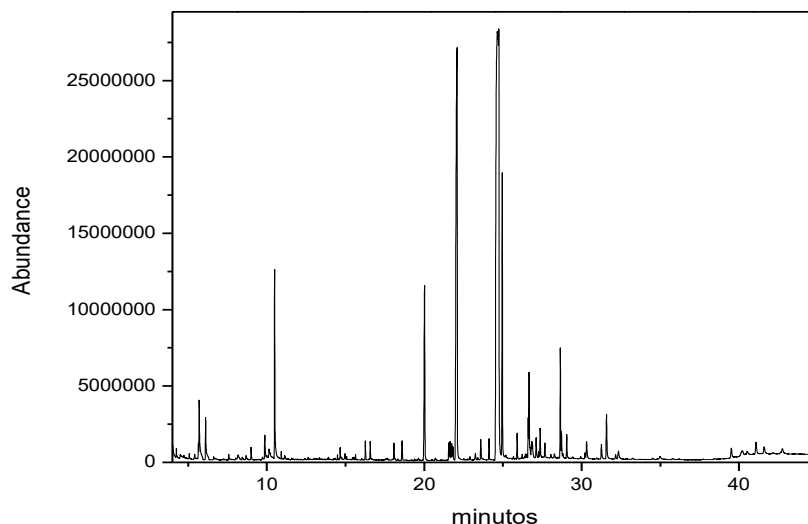
**Figura 42.** Comparación de cromatogramas de extracto control y extracto adicionado con AAS, en la imagen de abajo se muestra la zona de mayor diferencia.

En esta zona encontramos como compuesto importante al 3,5,7, trimetoxi-2-(4metoxifenil)-4H-1-benzopiran-naltrexon, compuesto con la fracción flavonoide, es una sustancia química importante bioactiva que exhibe actividad antifúngica para inhibir el crecimiento o germinación de las esporas (López F.R.,1954). Esto nos demuestra que la adición del AAS incrementa la actividad metabólica de los cultivos lo cual se ha demostrado en cultivos de plantas, sin embargo, es la primera vez que se realiza con hongos medicinales.

### 7.8.3 Compuestos con derivatización de DMSO

Continuando el análisis por cromatografía de gases, pero ahora de los constituyentes obtenidos por extracción con DMSO se obtuvieron una serie de compuestos característicos que podremos observar en la figura 43, siendo este el perfil cromatográfico, que caracteriza a ambos extractos, con la diferencia en abundancia que se indica en la tabla 9.

Los principales compuestos presentes en ambos extractos son: el éter etílico del ácido linoleico, éter etílico del ácido hexadecanoico y ácido octadecanoico en ambos extractos.



**Figura 43.** Perfil cromatográfico del extracto de *G. lucidum* con derivatización de DMSO.

Algunos compuestos que se encuentran en menor detección y con variabilidad en el extracto adicionado con AAS, por ejemplo la cortisona, ácido hexadecanoico que es un (compuesto antimicrobiano), topotecan compuesto usado como opción terapéutica para las mujeres con cáncer de ovario (Kim *et al.*, 2015). Derivados de bufanolidos, siendo estos de importancia por su efecto anticancerígeno. Complejos de colestano usados como antiviral y modulador de eventos epilépticos (Tang *et al.*, 2015)., derivados de esteroides investigados por efecto como relajantes musculares.

Sin embargo, con esta técnica se pudieron detectar mayormente compuestos de ácidos orgánicos en forma de ésteres como se observa en la tabla 9.

Se ha reportado que la presencia de ciclooctanos, así como los derivados identificados como ciclooctasulfuro y ácido oleico recuperados de cultivos de *G. lucidum* inhiben la liberación de histamina, justificando en parte los efectos del hongo en alergias, procesos inflamatorios y shock anafiláctico (Ríos-Cañavete, 2008).

**Tabla 9.** Compuestos encontrados con derivatización con DMSO.

COMPUESTO	T.R. (min)	Extracto control (%)	DS	Extracto con AAS (%)	DS
3-metil-1-butanol Éster etílico ácido pentadecanoico	3,71	0,082	0,01	2,85*	0,01
Éster etílico ácido hexadecanoico	20,0	0,63	0,08	5,13*	0,04
Éster etílico ácido heptadecanoico.	22,025	4,13	0,02	20,63*	0,5
Éster etílico del ácido linoleico	23,588	0	0	0,5*	0,03
Ácido octadecanoico, éster etílico	24,598	9,54	0,09	39,45*	0,025
Etil 9,12,15 octadecatrienoate	24,929	4,43	0,002	12,23*	0,05
Metil éster 10,13 ácido eicosadienoico	27,66	0	0	0,59*	0,01
Éster diisooctílico del ácido 1,2 bencenodicarboxílico,	28,05	0	0	3,48*	0,02
Etiltetracosanoate	28,652	0,61	0,003	1,98*	0,03
4-[3-piridil]-3-tiosemicarbazona	31,579	0	0	1,32*	0,04
	41,078	0	0	0,47*	0,05

(\*) indica  $p < 0.05$  en comparación con el control y muestra AAS usando ANOVA de una vía.

Como se observa en la tabla 9, en todos los casos existe un incremento de la presencia de compuestos en el extracto adicionado, estos ácidos pueden tener una relación directa por la fragmentación de moléculas mayores como los ácidos ganodéricos y también están presentes en los extractos por el carácter lipídico de algunos componentes propios del extracto, o bien por la fragmentación de los ácidos ganodéricos o por la oxidación de alcoholes. El ácido que mayor presencia tiene es el ácido octadecanoico (C18) y hexadecanoico (C16) con sus diferentes isómeros y después el ácido eicosanoico (C20), esto refuerza la hipótesis que la presencia del ácido octanoico presente en *G. lucidum* permite disminuir problemas alérgicos, antiinflamatorios y anafilácticos (Ríos-Cañavate, 2008). Así también, mejora la actividad de la memoria disminuyendo o evitando problemas contra el Alzheimer (Xiao-Ni *et al.*, 2017).

Los compuestos de mayor importancia detectados con esta técnica se presentan en la tabla 10 y 10a, no necesariamente son los más abundantes, pero que presentan características de los ácidos terpenoides que se esperan como producto de ácido ganoderico o sus fracciones.

**Tabla 10.** Compuestos característicos tipo terpenoide o sus fracciones detectadas en ambos extractos por la derivatización con DMSO.

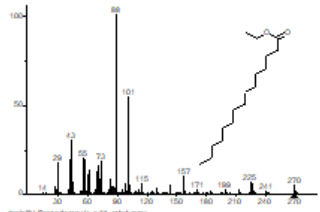
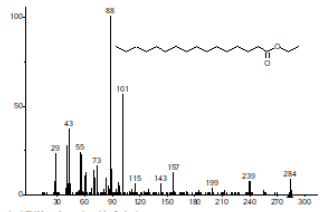
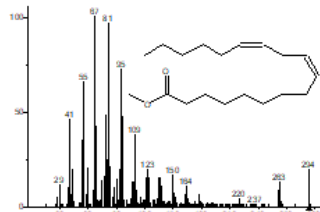
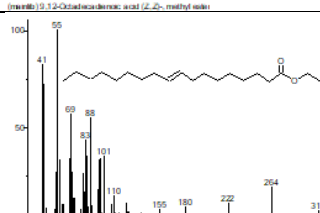
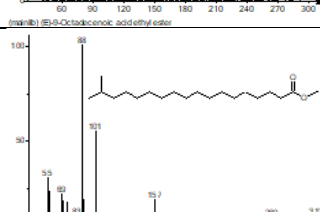

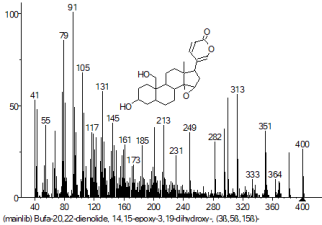
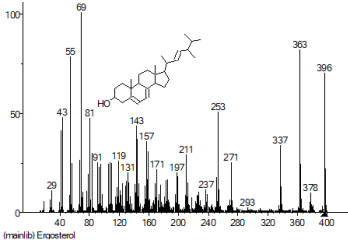
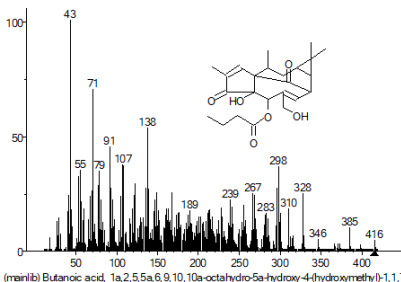
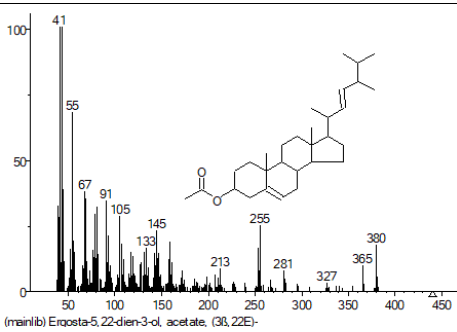
T.R. (min)	Compuesto	ESTRUCTURA	% Control	% AAS
20.03	Ácido Pentadecanoico etil Éster		0.63	5.13
22.05	Ácido linoleico étil éster		4.13	20.08
24.59	9,12-Octadecadienoic ácido, metil éster		9.54	6.52
24.64	9-Octadecenoic ácido etil éster		0.85	39.45
24.92	Metil- 17-methyl-octadecanoate		0.85	5.62

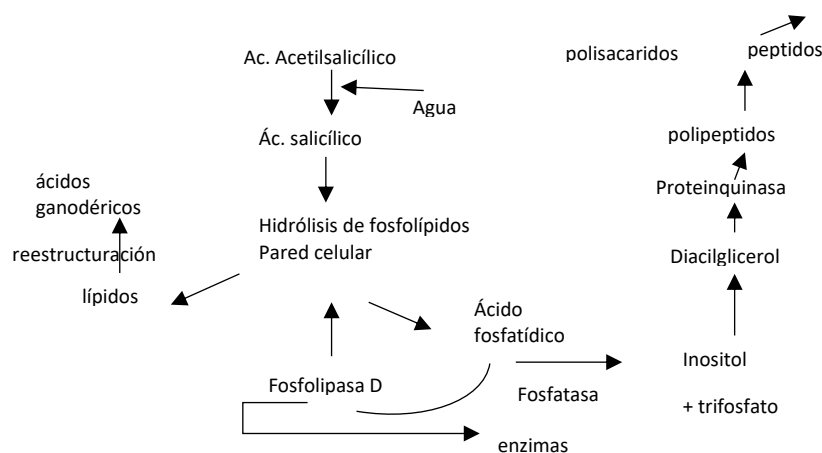
Tabla 10a. Compuestos característicos tipo terpenoide o sus fracciones detectadas en ambos extractos por la derivatización con DMSO continuación

T.R. (min)	Compuesto	ESTRUCTURA	% Control	% AAS
28.65	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester		0.61	0.61
39.49	14,15-epoxi-3,19-dihidroxi-(3B,5B,15B- Bufano-20,22-dienolide		0.10	0.14
40.21	Ergosterol		0.32	0.62
41.09	1a,2,5,5a,6,9,10,10a-octahidro-5a-hidroxi-4(hidroximetil)- 1,1,7, ácido Butanoico		0.24	0.47
45.96	Acetate (3B, 22E)Ergosta-5,22-dien-3-ol		0.12	0.18

En las diferentes técnicas que se emplearon para la detección de compuestos se logró observar el incremento de la mayoría de estos en el extracto adicionado con AAS, lo que sugiere un efecto causado por la adición del AAS, las propiedades que confieren a la mezcla que conserva e incrementa las propiedades que se han reportado dentro de las características de *G. lucidum* siendo este un recurso genéticos mexicano que igual en su actividad a *G. lucidum* asiático con la ventaja de ser un extracto estandarizado desde la cosecha hasta la obtención del extracto, teniendo una rica fuente de compuestos bioactivos que recientemente se ha probado, ejemplo de ello, el trabajos que muestran propiedades hipocolesterolémicas y efectos prebióticos probado para disminuir el nivel de colesterol en plasma de ratones (Meneses *et al.*, 2016).

#### 7.8.4 Propuesta de afectación de AAS a *G. lucidum*

Los fosfolípidos son uno de los constituyentes importantes en la pared de *G. lucidum*, estos responden a cambios biótico y abióticos a través de la secreción de enzimas como la fosfolipasa, lo que genera cambios en los fosfolípidos a través de la eliminación de la lisofosfatidato aciltransferasa (LPAAT) lo que desencadena el crecimiento del hongo, la diferenciación celular (Gao *et al*, 2016). Se incrementan las cantidades de fosfatidilinositol y disminuyen los lípidos en la membrana, pero aumentan en una extracción de sus componentes, lo que promueve el incremento de ácidos ganodéricos.

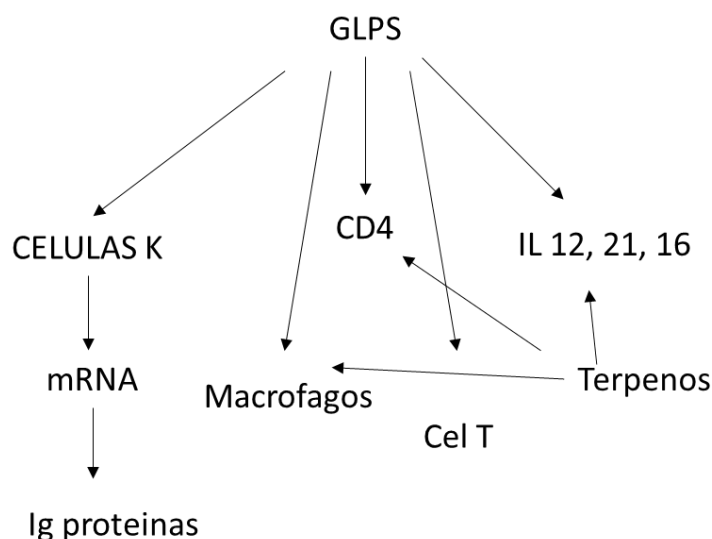


**Figura 44.** Propuesta de afectación del AAS al metabolismo de *G. lucidum*.

## 7.9 Análisis del potencial farmacológico del extracto estandarizado de *G. lucidum* y su impacto en la salud humana

Debido a las evidencias generadas por los métodos analíticos modernos, la bioquímica de *Ganoderma* ha sido ampliamente usada y estudiada, centrándose en *G. lucidum*, *G. sineces*, *G. tsugae*, *G. capense*, *G. applanatum* y *G. australe*. Más de 300 informes han sido publicado sobre los componentes químicos de *Ganoderma* y nuevos compuestos farmacológicamente activos aislados de sus basidiocarpos, esporas y micelio respaldados con bioensayos (Dell y Morris, 2001; Eckermann *et al.*, 2002). Más de 180 sustancias químicas han sido aislados de *Ganoderma*, que incluyen principalmente polisacáridos, triterpenos, nucleósidos, ergosteroles, ácidos grasos, proteínas / péptidos y elementos traza (Gao y Zhou, 2003).

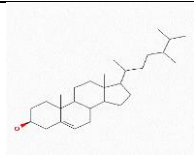
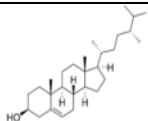
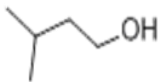
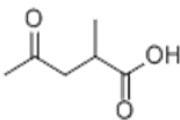
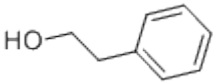
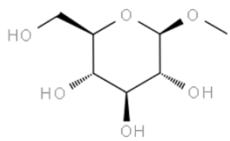
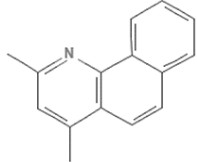
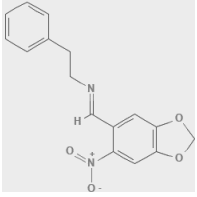
En el presente trabajo se detectaron compuestos que al usar la técnica de cromatografía de gases acopado a un espectrómetro de masas con ayuda de la base de datos NIST08, permitió conocer compuestos más específicos, así con ello establecer la funcionalidad de los compuestos que se pueden extraer de los basidiocarpos y que aportan beneficios en conjunto con los grandes grupos ya reportados (Tabla11).

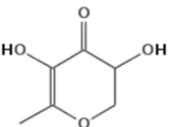
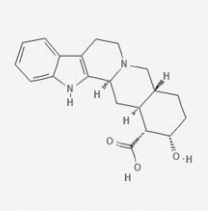
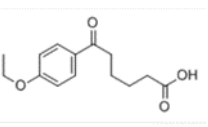
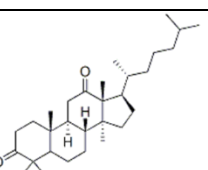
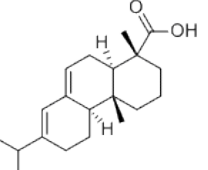


**Figura 45.** Interacción de los GLPS y Terpenos con la salud.



**Tabla 11.** Funcionalidad de Compuestos en Extractos de *G. lucidum*.

Compuesto	Estructura	Funcionalidad reportada	Cita
(3.β 24R)Ergost- 5-en-3-ol,		Artralgia, amenorrea, escaldaduras, quemaduras, traumáticas.	ictericia, tos, lesiones Min Rey <i>et al.</i> , 2017
Campestanol		Reductor de colesterol y de niveles LDL	Kircher y Rosenstei, 1974
3-Metil-1- butanol		Aplicaciones industriales a partir de bacterias	Connor <i>et al.</i> , 2010
2-metil-4- oxo-ácido pentanoico		Actividad Antioxidante	Zhang, 2017
Alcohol Feniletil		Actividad Antibiótico y Antioxidantes	Lingappa <i>et al</i> , 1969
Metil β- Glucopiranosido		antieméticos, antiulcerosos, antibacterianos, antiinflamatorios, amnésicos, anticancerígenos, disminuye la hipertensión.	Ichimura <i>et al.</i> , 1997. Castañeda <i>et al.</i> , 2018 anti-Strugala <i>et al.</i> , 2017 Rebholz <i>et al.</i> , 2018
2,4-dimethyl- benzo [h] quinoline		Actividad antibacterial	Shushizadeh, <i>et al.</i> , 2018
4-dehydroxy- n-(4,5- methylenedio xy-2- nitrobenzylid ene) tyramine		Actividad Antibacterial	Shengbo <i>et al.</i> , 2015

2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-one		Actividad antioxidante	Čechovská <i>et al.</i> , 2011
ácido yohimbico		Efectos adversos a sedación, vasocostricor o vasodilatador, Hipotensante	Pei and Bryden, 2015
ácido 6- (4-etoxifenil) -3-metil-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indolo-2-carboxílico éster isopropílico		Actividad antimicrobiana	Balachandar <i>et al.</i> , 2016
Lanostane-3,12-diona		Actividad antimicrobiana Inmunosupresor, Antihistamínico	Balachandar <i>et al.</i> , 2016
Ácido Abietico		Mejora la migración celular y la formación de tubos en las células endoteliales vasculares de la vena umbilical humana, mediante la regulación positiva de la quinasa regulada por señal extracelular y la expresión. inhiben la proteína tirosinefosfatasa 1B	Martínez-López, 2017
4 fenoxi-5,6-2Hpiridazin-3-one		Inhibidor tumoral y actividad antioxidante	Nehal <i>et al.</i> , 2013

En la revisión de 81 estudios de química calificada bioquímica, preclínica y clínica reportados tanto en inglés como en chino desde 1973 hasta 2017 mediante búsquedas en CNKI (China National Knowledge Infrastructure) y la base de datos Wanfang y PubMed demostraron que la aplicación de GLPS es eficiente en tratamiento de enfermedades como a continuación se menciona:

### **7.9.1 Eficiencia de los polisacáridos de *G. lucidum* (GLPS) en la regulación del sistema inmune**

En estudios de los GLPS demostraron que podría mejorar la función inmune del huésped, activar la respuesta inmune y por lo tanto inhibir el crecimiento de células tumorales, no presenta citotoxicidad hacia las células S180 y PG *in vitro*. Sin embargo, el suero de ratones tratados con GLPS inhibieron significativamente S180 y PG. Además, los GLPS promueve la proliferación de linfocitos esplénicos inducida por ConA o LPS y mejora la actividad citotóxica de las células NK.

### **7.9.2 Efecto de estudios clínicos en miopatías**

Las miopatías son una patología basada en una deficiencia o anomalía en los grupos musculares, de origen y tratamiento diversos, donde intervienen: el impulso nervioso, la membrana muscular y proteínas responsables de la contracción muscular. Cuando se ha tratado por inyección de GLPS de *G. lucidum* particularmente el fármaco llamado "inyección de Ji 731" en pacientes con rinitis atrófica leve, moderada y grave, las tasas efectivas son del 80%, 67% y 33%. También se ha recomendado para enfermedades desmielinizantes y enfermedades del sistema nervioso con una eficacia del 75%.

### **7.9.3 Actividad como hipoglicemiante e hipolipemiante**

De 100 mg / kg o más, los GLPS puede reducir los niveles de azúcar en la sangre en ratones con hiperglucemia, y con una dosis de sonda de 200 mg / kg, los GLPS reducen los niveles de azúcar en sangre y aumentan la secreción de insulina, disminuyendo significativamente los niveles de TC, TG y LDL-C y aumentan el nivel de HDL-C 0.55 en suero, recuperan las células B y mejoran la actividad de la glucónicas hepática en el modelo de ratón (Zeng *et al.*, 2018).

## VIII CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos muestran que los extractos hidroalcohólicos de *G. lucidum* control y *G. lucidum* adicionado con AAS presentan compuesto de importancia medicinal, siendo la más abundante los  $\beta$ -glucanos y los polisacáridos así como polialcoholes, sin embargo el extracto obtenido de los basidiocarpos adicionados en el sustrato con AAS, presentan una mayor presencia de estos compuestos, también se detectan otros compuestos importantes no reportados como el topotecan, derivados de bufanolidos, importantes por su efecto anticancerígeno y antitumoral, compuestos que complementan e incrementan la actividad funcional propia de *G. lucidum*. Estas propiedades del extracto de *G. lucidum* adicionado demuestran que fueron diferentes de aquellas presentes en *G. lucidum* sin adicionar, en función de lo anterior, se aceptó la hipótesis planteada.

## IX CONCLUSIONES

1. *Ganoderma lucidum* nativo de México cepa CP-145 por su naturaleza es un hongo medicinal que contiene compuestos funcionales y medicinales que al ser propuesto como un extracto estandarizado y adicionado durante su cultivo con AAS, mejora sus propiedades, se encontró un incremento hasta 4.7 veces más en el contenido de sus azúcares reductores, importante propiedad que le caracteriza en su actividad como antioxidante, contiene aminoácidos de origen que se ven incrementado hasta en 2 veces más, siendo prolina el que presenta mayor incremento, seguido de serina, valina, metionina y alanina estos son los promotores de proteínas ácidos nucleicos y en algunos casos esenciales para el buen funcionamiento de la salud. También presenta un alto contenido de B-D-glucano metil, que ayudan a evitar o disminuir problemas de obesidad, diferentes tipos de cáncer, afecciones cardíacas y como protectores en quimioterapias. Dentro de los sacáridos presentes tenemos a manosa y alcoholes precursores de azúcares como el arabinol, xilitol, ribitol, L-lixosa, allo-inositol, en una cantidad mayor que los extractos de cultivos tradicionales.
2. Se detectó dentro de los compuestos más importantes funcional y medicinalmente el ácido linoleico hasta 5 veces más y ácido 9-octadecanoico en forma de éster, éste último con un incremento hasta de 49 veces más en extracto adicionado, su importancia radica en la activación del sistema inmune, regula el metabolismo de grasas controlando el colesterol, reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares entre otras más.  
Se, detecto la presencia de compuestos en menor cantidad como el topotecan y el alfa-dimetil-benzen etanoamino anticancerígenos y antitumoral, hidroxil[(1-oxo-2-propenil) amino]- ácido acético, compuesto anti-obesidad y actividad ahipoglucemiente con ell se confirmar que el AAS incrementa el potencial de estas propiedades.  
La hipótesis que se genera es que el AAS y su derivado, el AS son los responsables de la inducción del incremento de la actividad metabólica.
3. Existen diversas metodologías que se han usado para la caracterización de los compuestos presentes en hongos medicinales y comestibles, sin embargo no

todos generan la información identificando los compuestos en particular, sino como un grupo, en este trabajo se logró la identificación de compuestos específicos como los ácidos presentes en los extractos, como los ácidos etanoico, metanoico, hexadecanoico, heptadecanoico, linoleico en forma de ésteres principalmente, esto nos permite reconocer la naturaleza química de los extracto, particularmente la cromatografía de gases acoplada a masas nos da identificación de la composición, sin embargo, su desventaja es ser una técnica costosa y requiere una mayor manipulación de muestra. También se encontró que la determinación de azúcares reductores aporta una información relevante en la caracterización de la naturaleza del extracto siendo una técnica sencilla, rápida y de costo accesible.

4. La técnica de RMN, no aportó suficiente información sobre la composición, pero si respaldó los resultados obtenidos al determinar la presencia de compuestos con enlaces  $\beta$  -1-3 y  $\beta$ -1-6. El índice de refracción que es una técnica muy usada en la industria de alimentos que contienen azúcares, en esta ocasión no brindó información suficiente por no obtener una diferencia significativa entre el extracto control y el extracto adicionado.
5. La información obtenida de este trabajo sirve de precedente para la cuantificación del contenido funcional de extractos de *G. lucidum*.

## **X. Estrategia para el aprovechamiento de las propiedades los recursos genéticos del *G. lucidum***

Esta propuesta parte de la definición general de recursos genéticos, la cual incluye todos aquellos materiales genéticos, con valor real o potencial, que contienen unidades funcionales hereditarias y que provienen de microorganismos, plantas, animales u otros. El término considera tanto a los materiales que ya han sido descubiertos, como aquellos materiales aún por descubrirse.

La estrategia se define al aportar información a través de investigación de las características de uno de los hongos medicinales de mayor importancia como lo es *G. lucidum*, siendo esta una acción relevante para desarrollar y fortalecer las tareas de vigilancia, regulación sanitaria y protección de la salud de las personas a nivel nacional. Aunado a este objetivo se cuenta con el mejoramiento de las propiedades de *G. lucidum*, por medio de la adición de un compuesto cuya funcionalidad se ha demostrado en plantas, pero en esta ocasión es aplicado en hongos de importancia médica y funcional. Toda vez que es necesario demostrar a partir de su caracterización la presencia de compuestos que brinden las propiedades y funcionales y medicinales propias de este hongo (Sobal *et al.*, 2007).

Los objetivos del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) son: 1) Mantener y conservar el germoplasma nativo procedente de diversas regiones del país; 2) Caracterizar el germoplasma nativo a nivel molecular, de diferentes hongos comestibles dentro de los que destacan: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula* y *Ganoderma*, del cual se cuenta con base de datos; y finalmente 3) Establecer programas de mejoramiento genético en combinación de herramientas como la genética y análisis físico-químicos para desarrollar y comprobar las características y mejoras de las nuevas generaciones de cepas (Sobal *et al.*, 2007) .

El desarrollo de esta estrategia impulsa un paquete tecnológico en el cual se encuentra beneficiada la sociedad solucionando problemas socioeconómicos y en apoyo a la cadena agroalimentaria emergente, también apoyando al sector productivo social (productores rurales) y privado (empresas) del país, a través del Centro de Vinculación con el Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles (Sobal *et al.*, 2007).

Sin embargo, es necesario generar información que sea capaz de compaginar con los objetivos de la COFEPRIS que dentro las funciones de esta dependencia está la de establecer e implementar políticas, programas y proyectos al nivel de la mejor práctica internacional, en coordinación efectiva con los diferentes actores del ámbito público, privado y social, para prevenir y atender los riesgos sanitarios, contribuyendo así a la salud de la población.

Debido a que la COFEPRIS también impulsa los principios de eficiencia, con procesos de autorización, vigilancia y fomento sanitario, basados en sistemas de calidad y mejora continua; de competitividad, al promover el desarrollo económico, a través de la regulación sanitaria, la eliminación de barreras de entrada al mercado y la simplificación de medio centenar de trámites; y el principio de la visión global, ya que se trata de un organismo basado en las mejores prácticas reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS). México logró su preingreso al Esquema de Cooperación de Inspección Farmacéuticas y se trabaja en la creación del Centro de Excelencia COFEPRIS. Esto puso en marcha la estrategia de liberación de medicamentos genéricos, con 37 sustancias activas que corresponden a 491 nuevos registros de medicamentos que atienden 71% de las causas de mortalidad en la población mexicana y ha permitido una reducción promedio de 55% en los precios de los medicamentos. (COFEPRIS, 2018b).

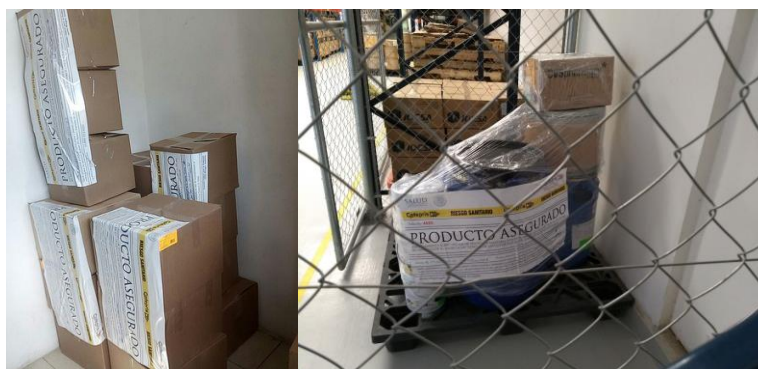
Como antecedente de estos trabajos se tiene que el pasado 5 de junio de 2018, se firmó un convenio de colaboración con la Federación Nacional de la Industria Herbolaria, Medicina Alternativa, Tradicional y Naturista A.C. (FNIHMATN), esto ha permitido generar una regulación sanitaria que toma en cuenta los productos utilizados y elaborados por el sector herbolario y de medicina tradicional en el país en base a años de investigación de las propiedades que se le confieren (COFEPRIS, 2018a).

Como una acción en la aplicación de las actividades en investigación y aseguramiento de vigilancia sanitaria con fecha 17 de octubre de 2018, la COFEPRIS anuncia la liberación de 18 plantas medicinales herbolarias, para su uso legal. Las presentaciones varían desde tés, infusiones o suplementos alimenticios, lo que permitirá que productos de tipo natural y clasificados como “no medicamentos” puedan



ser comercializados bajo la aprobación de esta dependencia, siempre que cuenten con un respaldo sustentado en investigación y cumpliendo con las normas oficiales de salud y producción, así como de un etiquetado adecuado, demostrando ser productos de calidad y eficacia en beneficio de la salud de la población. Dentro de estos productos podemos encontrar a *Ganoderma lucidum* (hongo Reishi), reconocido como uno de los suplementos más usados como antienvjecimiento y como un producto anticancerígeno, aunque por el momento solo se cuenta registrado una marca para su comercialización.

Durante el periodo 2011-2017 esta dependencia aseguro 4.5 millones de productos denominados “productos milagro” (COFEPRIS, 2018), que no cumplen con las especificaciones del producto que ofrecen y por lo tanto también incumplen en el contenido de los compuestos funcionales, esto bajo diferentes presentaciones como son suplementos alimenticios en tabletas y cápsulas, tanto a granel como productos terminados (Figura 46).



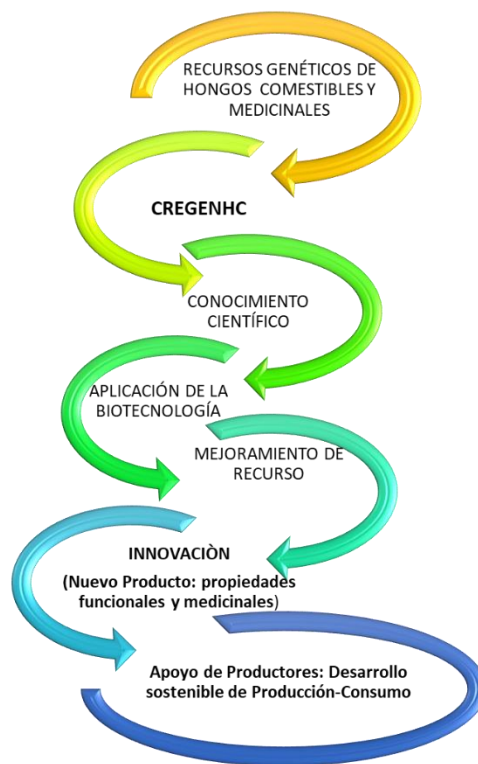
**Figura 46.** Aseguramiento de productos milagro en Puebla por parte de COFEPRIS.  
Foto: Cofepris/galerías.

Este aseguramiento se llevó a cabo con fecha 12 de febrero de 2018 en el estado de Puebla, en el cual fueron retiradas del mercado 1,139 piezas de mercancía que podrían poner en riesgo la salud de la población y se suspendieron actividades en cuatro establecimientos. Entre las marcas irregulares se encuentran: Puro Campeón (proteína hidrolizada), After Shock (recuperador de ejercicio), Yellow Scorpion (píldoras de dieta y energía), I am god (nutrición deportiva), Psychotic (estimulante en polvo preentrenamiento, Beastmode Black (Fructoborato de calcio,

intensificador de salud) y Animal Fury (Bolero con Stevia, nutrición zero, extracto de cúrcuma, macrobiótica, harina de avena), entre otras.

En la presente estrategia se plantea la generación del respaldo informativo a través de un certificado que bajo lineamientos científicos establezca el contenido de los extractos obtenidos a partir de la investigación realizada. Siendo esto un requisito indispensable para respaldar dos productos, el “**Extracto hidroalcohólico de *G. lucidum***” y el “**Extracto hidroalcohólico de mejorado con AAS de *G. lucidum***”, resultado de un paquete biotecnológico generado en el COLPOS *Campus* Puebla.

El diagrama de trabajo se indica a continuación:



**Figura 47.** Diagrama de estrategia para el aprovechamiento de las propiedades los recursos genéticos del *G. lucidum*.

## 10.1 Alcance

Generar información de un producto que garantice la función descrita en base a la presencia de los componentes que debe contener.

## 10.2 Alcance a futuro

Generar una lista de productos aceptados ante COFEPRIS con soporte informativo de los compuestos presentes.



**Figura 48.** Posibles productos derivados de los extractos de *G. lucidum*.

Para conocer los recursos con que se cuenta para la aplicación de este paquete biotecnológico como propuesta de estrategia se presenta un cuadro matriz de potencialidades de producción y beneficios.

**Tabla 12.** Matriz de Potencialidades y Beneficios.


Área temática	Potencialidades	Beneficios
Recursos naturales	Se cuenta con los recursos genéticos con características nativas mexicanas con amplia adaptabilidad CP-145	La extracción de los basidiocarpos es una técnica ya patentada por el CREGENHC en aplicación
Infraestructura	Como los paquetes que ofrece el COLPOS, se inicia con escalamiento siendo un producto con potencial a autofinanciarse en su desarrollo	Es necesario el respaldo del COLPOS para su lanzamiento ya que se cuenta con el recurso genético, conocimiento e investigaciones para soporte científico
Aspectos Institucionales	Se cuenta con todo un respaldo de investigación para soportar ante COFEPRIS y las autoridades de vigilancia la inocuidad del producto, así como garantizar los beneficios ofrecidos	Investigación de años generada por el CREGEN HC y el seguimiento del desarrollo y vigilancia como proyecto
Aspectos Sociales	Es un paquete tecnológico que se puede ofrecer a la sociedad e industria para su explotación y aportar soluciones en el sector salud por desarrollar dentro de un marco legal.	La sociedad se puede beneficiar de la capacitación por parte del COLPOS, apoyo a la medicina alterna.
Aspectos de Salud	Se habla de un recurso natural con un potencial ya verificado y potencializado que estará al alcance de la sociedad con problemas en salud y con el menor de daño en su tratamiento, pero principalmente en forma preventiva teniendo a la larga resultados muy marcados.	Costo bajo, al alcance de cualquier nivel social, teniendo niveles de aplicación y cubriendo un área de salud con muchas deficiencias a la fecha
Resultados de Investigación	Servir de base para evidenciar ante COFEPRIS el respaldo	

### 10.3. Actores sociales


El dar a conocer y generar una propuesta de uso de las propiedades benéficas a la salud de *G. lucidum* no es una actividad fácil, debido a que se deben conjuntar las partes de una sociedad para obtener un producto de calidad, estandarizado, sustentable y esto involucra a cada área social que tome su responsabilidad para lograr este objetivo:

1. Comunidad científica, tenemos al COLPOS *Campus* Puebla, como generador del paquete biotecnológico y quien dirigirá dicho proyecto, así como otra institución de investigación de índole nacional e internacional que aporte información de las características benéficas de *G. lucidum* por su investigación y algunas pocas de interés privado.
2. Productores: Es un proyecto a escalamiento donde inicialmente se genera el extracto bajo condiciones controladas de *G. lucidum* en el COLPOS *Campus* Puebla y se continúa en capacitar a un sector agrícola interesado donde se genere el producto y posiblemente se reúnan las cosechas para su tratamiento, la siguiente etapa sería hacer a nivel industrial para que el extracto cumpla con los requerimientos.
3. Comercios: Este proyecto genera el extracto con los beneficios del *G. lucidum* que pueden ser ofrecidos como un medicamento preventivo de enfermedades y algunos casos como tratamiento a las mismas adjunto con otros tratamientos ya que no causa interferencia en la acción farmacológica de los fármacos alópatas o tratamientos de quimioterapia, por el contrario, sirve de refuerzo para la persona. Ante estos beneficios se debe proponer la idea de su comercialización y patente.
4. Autoridades Salud: Se debe realizar el registro de autorización de uso ante esta dependencia siguiendo los pasos establecidos por protocolo y dentro de los cuales se debe incluir un certificado de contenido.

## 10.4 Certificado de Extracto de *Ganoderma lucidum*

 <b>COLEGIO DE POSTGRADUADOS</b> <small>INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS            CARRETERA CORDOBANA METECLLO PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TAMPICO-VERACRUZ</small>			
<b>CERTIFICADO DE ANÁLISIS</b> <b>EXTRACTO ESTANDARIZADO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i></b> <b>LOTIC: 001</b>			
Parámetro	Valor	Unidad	Técnica empleada
Densidad	1.256	g/cm <sup>3</sup>	Gravimétrica
Azúcares reductores	8.784	%	Método de Fehling
Aminoácidos	0,00015	%	Resonancia Radio iónica
Ácidos orgánicos	0,004	%	CG/EM
<small>PERMISO COFEPRIS: COFEPRIS 0000001</small>			

 <b>COLEGIO DE POSTGRADUADOS</b> <small>INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS            CARRETERA CORDOBANA METECLLO PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TAMPICO-VERACRUZ</small>			
<b>CERTIFICADO DE ANÁLISIS</b> <b>EXTRACTO MEJORADO ESTANDARIZADO DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i></b> <b>LOTIC: 001</b>			
Parámetro	Valor	Unidad	Técnica empleada
Densidad	1.568	g/cm <sup>3</sup>	Gravimétrica
Azúcares reductores	41.32	%	Método de Fehling
Aminoácidos	0,0003	%	Resonancia Radio iónica
Ácidos orgánicos	0,2	%	CG/EM
<small>PERMISO COFEPRIS: COFEPRIS 0000001</small>			

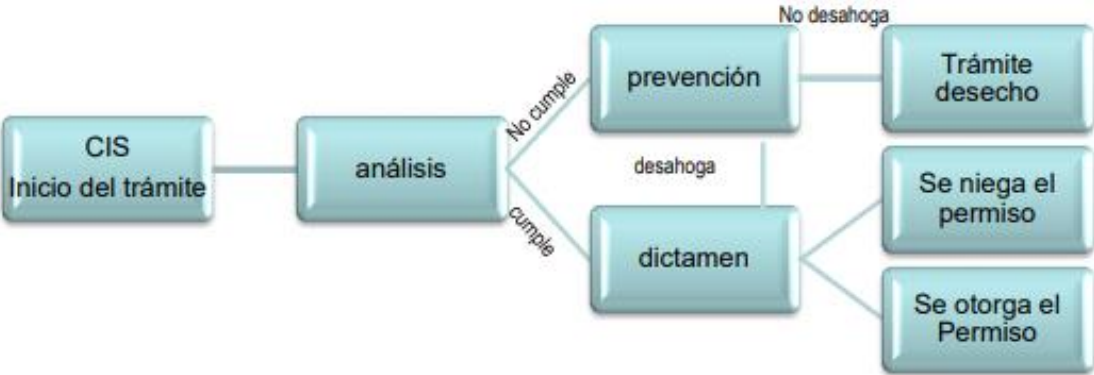
**Figura 49.** Certificados de extractos de *G. lucidum* CP145.

Otra acción que debe considerarse es el convenio en el marco del “Foro de Regulación Sanitaria en materia de Medicina Tradicional, Alternativa y Complementaria, Alimenticia y Cosmética”, que permitirá generar acuerdos puntuales para configurar una regulación sanitaria acorde a la realidad de la industria herbolaria atendiendo los lineamientos de Cofepris, y poder introducir el extracto estandarizado con la sociedad.

La Autorización Sanitaria que debe cubrirse con base a Reglamento indica que con el fin de proteger la salud pública, es competencia de la Secretaría de Salud la autorización de los productos que se refiera a la salud, al tratamiento de las enfermedades, a la rehabilitación de los invalidos, al ejercicio de las disciplinas, productos y servicios para la salud.

También que serán objeto de autorización por parte de la Secretaría de Salud presentar la información existente de la calidad y características, así como para

promover su uso, venta, consumo en forma directa o indirecta de los insumos para la salud, las bebidas alcohòlicas, así como sus productos y servicios que se determinen en el reglamento en materia de publicidad (Figura 50).



**Figura 50.** Proceso que se debe seguir para obtener el permiso de uso y trámites de registro COFEPRIS

Se continuará con el registro de producto y la asignación de claves de la autorización sanitaria.

## XI LITERATURA CITADA

- Abdelrahman M., El-Sayed M., Jojana S., Burritt, D. J., y Tran, L. P. (2017). The "Stay-green" trait and phytohormone signaling networks in plants under heat stress. *Plant Cell Reports*, 36(7):1009-1025.
- Anchondo-Aguilar, A., Núñez-Barrios, A., Ruíz-Anchondo T., Martínez-Téllez, J., Vergara-Yoisura S. y Larqué-Saavedra A. (2011). Efecto del ácido salicílico en la bioproduktividad de la fresa (*Fragaria ananassa*) cv Aromosa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(2):293-298.
- Arango, C. S., y Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macro hongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1):1–8.
- Askin, R., Sasaki, M., y Goto, M. (2010). Recovery of water-soluble compounds from *Ganoderma lucidum* by hydrothermal treatment. *Food and Bioproducts Processing*, 88:291–297.
- Aysun, E., Hüseyin, O., Emre, B. B., Cenap, E., Senay, D. y Engin, D. (2018). Neuroprotective Effects of *Ganoderma lucidum* on Spinal Cord Injury. *International Journal of Morphology*, 36(1):175–179.
- Azuola, R. y Vargas, P. (2007). Extracción asistida (EUA) por ultrasonido. *Tecnología en Marcha*, 20(4):30-40.
- Balanchandar, R., Kumar, K.A. y Karmegam, N. (2016). GC-MS analysis of ethyl acetate extract of *Streptomyces* species isolated from vermicast. *Int J Pharm Bio Sci.*, 7(4):416–419.
- Barros, F.W., Bezerra, D.P., Ferreira, P.M. Cava, B.C., Silva, T.G., Pitta, M.G., Lima, D.C., Galdino, S.L, Pitta, I.R., Costa-Lotufu, L.V., Moraes, M.O., Burbano, R.R., Guecheva, T.N., Henriques, J.A.P. y Pessoa, C. (2013). Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol* 268(1):37-46.
- Beckford, F.A., Thessing, J., Stott, A., Holder, A., Poluektov, O., Liy, L. y Seeram, N. (2012). Anticancer activity and biophysical reactivity of copper complexes of 2-(benzo[d] [1,3] dioxol-5-ylmethylene)-N-alkylhydrazinecarbothioamides. *Inorganic Chemistry Communications*.15:225-229.
- Bennett, W.L., Wilson, L.M., Bolen, S., Maruthur, N., Singh, S., Chatterjee, R., Marinopoulbos, S.S., Puhan, M.A., Ranasinghe, P., Nicholson, W.K., Block, L., Odelola O., Dalal, D.S., Ogbeche, G.E., Chandrasekhar, A., Hutfless S., Bass, E.B. y Segal J.B. (2011). Oral Diabetes Medications for Adults with Type 2 Diabetes: An Update [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare



Research and Quality. (Comparative Effectiveness Reviews, No. 27.)  
Methods.

- Bernabé-González, T., Cayetano-Catarino, M., Bernabé-Villanueva, G., Romero-Flores, A., Ángel-Ríos, M.D. y Pérez-Salgado, J. (2015) Cultivation of *Ganoderma lucidum* on agricultural by-products in Mexico. *Micol. Apl. Int.*, 27(2):25-30.
- Boh, B. (2013). *Ganoderma lucidum*: A potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.*, 8:255-287.
- Can, Z., Dincer, B., Sahin, H., Baltas, N., Yildiz, O. y Kolayli, S. (2014). Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis* L.) from Turkey. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 29:829–835.
- Cann, A. F., y Liao, J. C. (2008). Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1:89-98.
- Cao, L.Z. y Lin, Z.B. (2002). Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Immunology Letters* 83:163-169.
- Cao, Q. y Lin, Z. (2006) *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. *Life Sci.*, 78:1457-1463.
- Cardoso, L. C., Díaz, V. C., y García, R. F. (2001). Determinación de azúcares reductores en miel final por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. *Centro Azúcar*, 28(2):17-23.
- Castañeda-Antonio, M. D., Martínez-Carrera, D. C., Rivera-Tapia, J. A., Reyes, R. P., Morales, A.P., Sobal, C., Macías, A., Lara H. L. (2018). Detección de polisacáridos en extractos de *Ganoderma lucidum*. *Nova Scientia*, 10(21):247–257.
- Čechovská, L., Cejpek, K., Konečný, M., y Velíšek, J. (2011). On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one in antioxidant capacity of prunes. *European Food Research and Technology*, 233(3): 367-379.
- Chai, H., Wang, F., Zhang, Z., Yang, J. y Zhang, Y. (1997). Constituents from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Zhongguo Zhongyao Zazhi—Chinese Journal of Materia Medica* 22:552–553.
- Chang, S.T. y Miles, P.G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press, 2a ed, pp39-41.

- Chen, A., (1999). Cultivation of the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Reishi) in North America., International Journal of Medicinal Mushrooms 1(3): 263-282.
- Chen, Y, Xie, M.Y. y Gong, XF. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. J Food Eng. 81:162–170.
- Chistyachenko, Y. S., Dushkin, A. V., Polyakov, N. E., Khvostov, M. V., Tolstikova, T. G., Tolstikov, G. A., y Lyakhov, N. Z. (2015). Polysaccharide arabinogalactan from larch *Larix sibirica* as carrier for molecules of salicylic and acetylsalicylic acid: preparation, physicochemical and pharmacological study. Drug Delivery, 22(3): 400-407.
- COFEPRIS, 2018. Productos milagro <https://www.gob.mx/cofepris/prensa/cofepris-cumple-con-su-compromiso-con-la-salud-de-los-mexicanos-y-seguira-trabajando-sanchez-y-tepoz-141198?idiom=es> 11 de noviembre de 2018.
- COFEPRIS,2018a. <https://www.gob.mx/cofepris/prensa/cofepris-anuncia-la-liberacion-de-18-plantas-medicinales-para-su-uso-legal?idiom=es> 11 de noviembre de 2018.
- COFREPRIS, 2018 b. [www.gob.mx/cofepris/prensa/la-cofepris-impulsa-una-politica-farmaceutica-responsable](http://www.gob.mx/cofepris/prensa/la-cofepris-impulsa-una-politica-farmaceutica-responsable) 11 de noviembre de 2018.
- Cong, W., Xu H., Liu, Y., Li, Q., Li, W. y Zhou, X. (2014). Production and functional characterization of a novel fungal immunomodulatory protein FIP-SN15 shuffled from two genes of *Ganoderma* species. Applied Microbiology & Biotechnology, 98(13):5967–5975.
- Connor, M.R., Cann, A.F. y Liao, J.C. (2010). 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. Appl Microbiol Biotechnol., 86:1155- 1164.
- Copen <http://copen.com.mx/nueva/mars3-analisis.php> 11 de noviembre de 2018.
- Copen <https://www.copen.us> 11 de noviembre de 2018.
- Cör, D., Botić, T., Knez, Ž., Gregori, A., y Pohleven, F. (2017). The effects of different solvents on bioactive metabolites and "in vitro" antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of *Ganoderma lucidum* fruiting body and primordia extracts. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 36(1):1-13.
- De Buijn, J., Loyola, C., Aqueveque, P., Cañumir, J., Cortéz, M. y France A., (2010). Extraction of secondary metabolites from edible Chilean mushrooms. Cap1. Pp3-17. En: Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-

consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI. Ed. D. Martínez-Carrera. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.

- Debsankar, D., Subhas, M., Sadhan, K. R., Debabrata, M., Bibhas, B., Tapas, K. M. y Syed, S. I., (2009). Isolation and characterization of a heteropolysaccharide from the corm of *Amorphophallus campanulatus*. *Carbohydrate Research* 344: 2581–2585.
- Deff, H. E. (2007). Influence of Salicylic Acid on Stress Tolerance During Seed Germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *Advances in Biological Research* 1 (1-2):40-48.
- Dell, A. y Morris, H. R. (2001). Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science* 291:2351–2356.
- Diassi, P.A. y Dylion, C.M. (1958). *Journal of the American Chemical Society*. Yohimbic Acid Lactone. Conversion of Yohimbine to  $\beta$ -Yohimbine. 80 (14): 3746-3748.
- Duggan, C., Gannon J., y Walker, W.A. (2002). Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5):789–808.
- Duru, M.E. y Tel C.G. (2015). Biologically Active Terpenoids from Mushroom origin: A Review. *Rec. Nat. Prod.* 9(4):456-483.
- Echavarría, C. A., y Mejía Gallón, A. I. (2010). Inducción de la actividad de lacasa en *Ganoderma* sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(4):519–532.
- Eckermann, N., Fettke, J. y Steup, M. (2002). Identification of polysaccharide binding proteins by affinity electrophoresis in inhomogeneous polyacrylamide gels and subsequent SDS-PAGE/matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analysis. *Anal. Biochem.* 304:180–192.
- Erickson, K.A. y Nes, W.R. (1982). Inhibition of hepatic cholesterol synthesis in mice by sterols with shortened and stereochemically varied side chains. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 79:4873-4877.
- Eroğlu, H. A., y Beytut, E. (2018). Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on oxidative damage in liver of STZ-diabetic rats. *Biomedical Research* 29(18):3436–3443.

- Esmaeilzadeh, M., Kianirad, M., Sheykhinejad, A., Khosravi, A., y Sharifzadeh, A. (2019). Ganoderic Acid and Exopolysaccharide Production by *Ganoderma lucidum* from Semi-Solid-State and Submerged Fermentation. *Biological Journal of Microorganism* 7(28):63–75.
- Esqueda, M., Coronado, M., Gutiérrez, A., Valenzuela, R., Chacón, S., Gilbertson, R.L., Herrera, T., Lizárraga, M., Moreno, G., Pérez-Silva, E. y Van Devender T.R. (2010). Hongos. En: Molina-Freaner E., Van Devender T.R. Eds., *Diversidad Biológica de Sonora*, pp. 189-205, Universidad Nacional Autónoma de México / Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.
- Florido, B.M. y Álvarez, G.M. (2015). Aspectos relacionados con el estrés de calor en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultrop* 36(1):77-95.
- Gao, J., Nakamura, N., Min, B.S., Hirakawa, A, Zuo, F. y Hattori, M. (2004). Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of Ganoderma products. *Chemical and Pharmaceutical, Bulletin* 4,52(6):688–695.
- Gao, Q., Lu, Y.Z., Yao, H.Y., Xu, Y.J., Huang, W., y Wang, C.S. (2016). Phospholipid homeostasis maintains cell polarity, development and virulence in metarhizium robertsii. *Environ Microbiol* 18: 3976–3990.
- Gao, Y. y Zhou, S. (2003). Cancer Prevention and Treatment by *Ganoderma*, a Mushroom with Medicinal Properties. *Food Reviews International* 19(3):275–325.
- García, M. J.A. y Gómez-Reino, C. J.J. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Rev. Española de Reumatología*. 27(1):1-40.
- Guo, C., Choi M. W. y Cheung, C.K. (2012). Mushroom and immunity. *Current topics in Nutraceutical research* 10(1):31-42.
- He, C., Li, W., Guo S., Lin, S. y Lin, Z. (2006). Effect of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Journal of Asian Natural Products Research* 8(8):705-711.
- Huang, S. Q., Li, J. W., Wang, Z., Pan, H. X., Chen, J. X. y Ning, Z. X. (2008). Optimization of alkaline extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their effect on immune function in mice. *Molecules* 15(5):3694-3708.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z. y Wang, J.W. (2009). Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multitest systems *in vitro*. *Food Chem.* 114:1147–1154.

- Hua-Wei, Zeng, y Hui, C. (2016). Optimization and validation of liquid chromatography and headspace-gas chromatography based methods for the quantitative determination of capsaicinoids, salicylic acid, glycol monosalicylate, methyl salicylate, ethyl salicylate, camphor and l-menthol in a topical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50:51-58.
- Ichimura I., Kohata, K., Koketsu, M., Yamaguchi, Y., Yamaguchi, Nh. y Suto K. (1997). Identification of Methyl  $\beta$ -Glucopyranoside and Xylose as Soluble Sugar Constituents in Roses (*Rosa hybrida L.*), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61(10):1734-1735.
- ISO 10012:2003 Measurement management systems -- Requirements for measurement processes and measuring equipment.
- Janssen, K.P.L.T., Katan, M.B., Staverena, W.A.V., Hollmanb, P.C.H. y Venema D.P. (1998). Acetylsalicylate and salicylates in foods. *Cancer Letters* 114(1):163-164.
- Jin, X., Ruiz- Beguerie J., Sze, DM., y Chan G.C. (2016). *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment. *Cochrane Database Sistema* 5(4): CD007731.
- Kała, K., Krakowska, A., Sułkowska-Ziaja, K., Szewczyk, A., Reczyński, W., Opoka W., y Muszyńska, B. (2017). Kinetics of extracted bioactive components from mushrooms in artificial digestive juices. *International Journal of Food Properties* 20(8):1796–1817.
- Kao, P, Wang, S, Hung, W, Lia,o Y., Lin, C., y Yang. W. (2012). Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 673764:1-8.
- Kim, H. W. y Kim, B. K. (1999). Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (*Aphyllophoromycetidae*). *Int. J. Med. Mushr.* 1:121–138.
- Kim, K.H., Tsao, R., Yang, R. y Cui, S.W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* 95:466–473.
- Kim, M.K., James, J. y Annunciata (2015). Topotecan synergizes with CHEK1 (CHK1) inhibitor to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 15:196-206.
- Kircher, H., y Rosenstein, F. (1974). Purification of campesterol and preparation of 7-dehydrocampesterol, 7-campestenol and campestanol. *Lipids*, 9(5): 333-337.

- Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S., Uchida, M., Kohda, H. y Yamasaki, K. (1985). Structure of new terpenoid constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. (Polyporaceae). Chem. Pharm. Bull. 33:4829–4835.
- Laine, C., Tamminen, T., Vikkula, A. y Vuorinen, T., (2002). Methylation Analysis as a Tool for Structural Analysis of Wood Polysaccharides, Structural Analysis of Wood Polysaccharides. Holzforschung 56(6): 607-614.
- León-Guzmán, M.F., Silva, I. y López, M.G. (1997). Proximate Chemical Composition, Free Amino Acid Contents, and Free Fatty Acid Contents of Some Wild Edible Mushrooms from Querétaro, México. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45 (11):4329-4332.
- Li, B. y Lu, Fei. (2012). Method and Analysis of Methylation of Polysaccharides. Nat Prod Res Dev. 24:79-83.
- Lingappa, B., Prasad, M., Lingappa, Y., Hunt, D., y Biemann, K. (1969). Phenethyl Alcohol and Tryptophol: Autoantibiotics Produced by the Fungus *Candida albicans*. Science, 163(3863):192-194.
- Lin, S.Q., Wang, S.Z., Lin, Z.B. y Lin, Y.X. (2003). Isolation and identification of active components of *Ganoderma lucidum* cultivated with grass and wood log I. Extraction, purification and characterization of glycopeptide. Chin Tradit Herbal Drugs 34:872-874.
- Li, S.Y., Zhao, Z.L., Li, Y., y Tang, X.M. (2012). Advances of fungal immunomodulatory proteins in macromycete. Biotech Bulletin 5:49–53.
- Lin, Z.B. (2005). Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. Journal of Pharmacological Sciences 99:144-153.
- Liu, J., Sin, Y., Yu, H., Zhang, C. y Yue, L. (2012). Purification and identification of one glucan from Golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer. Carbohydrate Polimers. 87(1):348-352.
- Liu, Y.N., Lu, X.X., Chen, D., Lu, Y.O., Ren, A., Shi, L., Zhu, J. Lian, A., Shou, H.Y. y Zhao, M.W. (2017). Phospholipase D and phosphatidic acid mediate heat stress induced secondary metabolism in *Ganoderma lucidum*. Environmental Microbiology, 19(11), 4657–4669.
- López, F.R. (1954). Fisiología de la germinación de esporas de *Monilia sp.* Cacao en Colombia (Colombia) (3):183-207
- López-Peña, D., Gutiérrez, A., Hernández-Navarro, E., Valenzuela, R. y Martínez E. (2016). Diversidad y distribución de *Ganoderma* (Polyporales: *Ganodermataceae*) en Sonora, México. Botanical Sciences 94 (2):431-439.
- López-Martínez, L. y Martínez, Carrera D. (2010). Producción comercial de hongos comestibles en España. pp591-608. En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales and V. Mora. Red Latinoamericana

- de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOSUNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP IMINAP, Puebla, México.
- Magdziak, Z., Mleczek, M., Gąsecka, M., Drzewiecka, K., Kaczmarek, Z., Siwulski, M. y Goliński P. (2016). *Agaricus bisporus* compost improves the potential of *Salix purpurea* x *viminalis* hybrid for copper accumulation. *International Journal of Phytoremediation*, 18(8):768-776.
- Martínez-Carrera, D., Sobal M., Morales P., Martínez W., Martínez M. y Mayett Y. (2004). Los Hongos Comestibles: Propiedades Nutricionales, Medicinales, y su Contribución a la Alimentación Mexicana. El Shiitake. COLPOS-BUAP-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Martínez-López, N. M. (2017) Efecto de la melatonina, leptina y ácidos grasos: docosahexaenoico, eicosapentaenoico y palmítico, en la modulación de la inflamación en células de glía (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).
- Martínez-López y García-González, M., Fernández-Concepción F., Álvarez-Lazo, D., y Martínez-Rodríguez E. (2017). Proceso de transformación de la materia prima para tableros de madera plástica. *Ingeniería Industrial*, 38(3):235–246.
- Masaphy. (2010). Biotechnology of morel mushrooms: successful fruiting body formation and development in a soilless system. *Biotechnology Letters*. 32(10):1523–1527.
- Mayett, Y. y Martínez-Carrera M. (2016). Estrategias para promover el consumo de hongos comestibles en México, con base en sus propiedades funcionales y medicinales. *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México*; Martínez-Carrera, D., Ramírez-Juárez, J., Eds, 856.
- Maury, G. L., Joaquín, C. H., Quevedo, M., Albear, J. M., Chibás, L. C., y Savón, R. C. B. (2011). Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 30(4):511–527.
- Mendoza, G., Guzmán, G., Ramírez-Guillén, F., Luna, M. y Trigos A. (2011). *Ganoderma oerstedii* (Fr.) Murrill (higher Basidiomycetes), a tree parasite species in Mexico: taxonomic description, rDNA study, and review of its medical applications. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 13:545-552.
- Meneses, M.E., Martínez-Carrera, D, Torres, N., Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Morales, P., Sobal, M., Bernabé, T., Escudero, H., Granados-Portillo, O., y Tovar, A.R. (2016). 'Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice', *Plos One*, 11(7): p.e 0159631.

- Miles, P. y Chang, S.T. (2004). *Ganoderma lucidum* a leader of medicinal mushrooms; Capítulo 19:357-372. En: Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. Eds. P. G. Miles y S.T. Chang. CRC Press, U. S. A.
- Min, Rye, Eom, Jin Bae Weon, Youn Sik Jung, Ga Hee Ryu, Woo Seung Yang, y Choong Je Ma. (2017). Simultaneous Determination of Four Compounds, Campesterol, Emodin8-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside, Quercetin, and Isoquercitrin in *Reynoutria sachalinensis* by High-performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector. *Pharmacognosy Magazine* 13:S258–S261.
- Miyazaki, T. y Nishijima, M. (1981). Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 29:3611–3616.
- Moncalvo, J.M. y Ryvarden, L. (2001). A Nomenclatural Study of the *Ganodermataceae* Donk. *Synopsis Fungorum* 11, Fungifora, Oslo.
- Morales, P., Sobal, M., Bonilla, W., Martínez, P., Ramírez-Carrasco, I., Tello, T. Spezzia, N., Lira, R., De lima, S., Villa, E., Montiel y Martínez Carrera D. (2010). Los hongos comestibles y medicinales en México: Recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo. Pp. 91-108. En: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales and V. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOSUNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP IMINAP, Puebla, México.
- Muszyńska, B.; Łojewski, M.; Rojowski, J.; Opoka, W. y Sułkowska-Ziaja, K. (2015). Natural Products of Relevance in the Prevention and Supportive Treatment of Depression. *Psychiatria Polska* 49: 435–453.
- Nambiar, V.S., Sareen, N., Mammen, D. y Gallego, E.B. (2012). Flavonoids and phenolic acids from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) based foods and their functional implications. *Functional Foods in Health and Disease*. 2(7):251-264
- Nehal, A. Hamdy, M. M. Anwar, Khadiga, M. Abu-Zied y Hanem, M. A. (2013). Synthesis, tumor inhibitory and antioxidant activity of new polyfunctionally 2-substituted 5,6,7,8-tetrahydronaphthalene derivatives containing pyridine, thioxopyridine and pyrazolopyridine moieties. *Acta Pol Pharm.* 70(6):987–1001.
- NMX-F-436-SCFI-2011 Industria azucarera y alcoholera - Determinación de grados Brix en jugos de especies vegetales productoras de azúcar y materiales azucarados - método del refractómetro.



- Nour, V., Corbu, A. R., Rotaru, P., Karageorgou, I., y Lalas, S. (2018). Effect of carotenoids, extracted from dry tomato waste, on the stability and characteristics of various vegetable oils. *Grasas y Aceites* 69(1):1–12.
- Özevren, H., Irtegün, S., Ekingen, A., Tuncer, M. C., Özkorkmaz, E. G., Deveci, E., y Deveci, S. (2018). Immunoexpression of Vascular Endothelial Growth Factor,  $\beta$ - cell Lymphoma 2 and Cluster of Differentiation 68 in Cerebellar Tissue of Rats Treated with *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Morphology* 36(4):1453–1462.
- Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., y Sun, W. (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, 8(3), 035020.
- Pai-Feng, K., Shwu-Huey, W., Wei-Ting, H., Yu-Han, L., Chun-Mao, L., y Wen-Bin, Y. (2012). Structural Characterization and Antioxidative Activity of Low-Molecular-Weights Beta-1,3-Glucan from the Residue of Extracted *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-8.
- Paliya, B.S., Chaudhary H., Verma S. and Prasad S. (2014). Optimization of fermentation media composition of *Ganoderma lucidum* for improved production of antioxidant and antimicrobial compounds. *Pharmacognosy Communications* 4(1):35-41.
- Pauwels, J., D'Áutry, Van den Bossche, L., Dewever, C., Forier, M., Vandewaeyenberg, S., Wolf, K., Hoogmartens, J., Van y Schepdale A., Adams, E., (2012). Optimization and validation of liquid chromatography and headspace-gas chromatography-based methods for the quantitative determination of capsaicinoids, salicylic acid, glycol monosalicylate, methyl salicylate, ethyl salicylate, camphor and l-menthol in a topical formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 60, 51-58.
- Pei- Chen, y Bryden, N. (2015). Determination of Yohimbine in Yohimbe Bark and Related Dietary Supplements Using UHPLC-UV/MS: Single-Laboratory Validation. *Journal of AOAC International* 98(4):896–901.
- Pizarro, C.S.A., Ronco, M.A.M. y Gotteland, R.M. (2014).  $\beta$ -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud *Rev Chil Nutr.* 41(3):439-446.
- Prince, R.L., Larkins, R.G.. y Alford, F.P. (1981). The effect of acetylsalicylic acid on plasma glucose and the response of glucose regulatory hormones to intravenous glucose and arginine in insulin treated diabetics and normal subjects. *Metabolism*. 30(3):293-298.

- Purcarea, C., y Cachiță-Cosma, D. (2008). Comparative Studies about the Influence of Salicylic and Acetylsalicylic Acid on Content of Assimilatory Pigments in the Primary Leaves of Sunflower (*Helianthus* sp.) Plantlets. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)* 18:51–54.
- Purcarea, C., y Cachiță-Cosma, D. (2010). Studies Regarding the Effects of Salicylic Acid on Maize (*Zea Mays* L.) Seedling under Salt Stress. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)* 20(1):63–68.
- Qu, Z.W., Zhou, S.Y., Guan, S.X., Gao, R., Duan, Z.W., Zhang X. y Ruan Y.Y. (2018). Recombinant Expression and Bioactivity Comparison of Four Typical Fungal Immunomodulatory Proteins from Three Main *Ganoderma* Species. *BMC Biotechnology*, 18(1):1–12.
- Quiroz-Cerezo, F.A. (2012) Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de dos especies del hongo medicinal *Ganoderma* nativo de México y su contribución al desarrollo regional. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla.
- Raskin, I., (1991). Salicylate, a new plant hormone, *Plant Physiol.*99:799-803
- Rathee, S., Rathee D., Rathee, D., Kumar, V. and Rathee P. (2012). Mushrooms as therapeutic agents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2):459-474.
- Roy, S. K., Debsankar D., Subhas M., Debabrata M., Bibhas B.; Maiti T. K., Islam S. S. (2009). Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cultivar Assam Florida. *Carbohydrate Research*. 344(18):2596-2601
- Rebholz, C.M., Lichtenstein, A. H.; Zihe, Z., Appel, L.J. y Coresh, J. (2018). Serum untargeted metabolomic profile of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) dietary pattern. *American Journal of Clinical Nutrition*, 108(2):243-255.
- Rendón-Hernández, G. A. (2015). Caracterización y cultivo de recursos genéticos de hongos y su importancia en el desarrollo regional de la zona central de México. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla.
- Ríos-Cañavate, J.L. (2008). *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades Inmunoestimulantes. *Rev. de Fitoterapia. Amefit.* 8(2):135-146.
- Rosecke, J. y Konig, W. A. (2000). Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry* 54:603–610.
- Roy, S.K., Debsankar, D., Subhas, M., Debabrata, M., Bibhas, B., Tapas, K. y Syed, S.I (2009). Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cultivar Assam Florida. *Carbohydrate Research* 344 (2009):2596–2601.

- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., and Lacomini, M. (2015). D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers* 117: 753-761
- Sarma, L., Chakraborty, S. y Duary, R.K. (2018). Solvent-based microwave-assisted extraction and identification of bioactive compounds from *Sesamum indicum* leaves using particle swarm optimization-integrated response surface methodology. *Phcog Mag* 4(57):S275-S283.
- Sárossy, Z., Plackett, D., y Egsgaard, H. (2012). Carbohydrate analysis of hemicelluloses by gas chromatography-mass spectrometry of acetylated methyl glycosides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403(7):1923–1930.
- Scotter, M.J. Dominic, P.T. Lesley, A.W., Wilson, F.A., Frances, A.C.H., Davis, J. y Mansell N. (2007). Free salicylic acid and acetyl salicylic acid content of foods using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* 105:273-279.
- Soliman, M. H., Alayafi, A. M., Kelish, A. A. y Abu-Elsaoud A. M. (2018). Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. *Botanical Studies*, 59(1):1-18.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta y Martínez-Carrera D. (2007). El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1, 14 pp. En: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp.* en México. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata and H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- Stojkovi, D.S., Barros, L., Calhelha, R.C., Glamočlija, J., Ćirić, A., Van Griensven, L.J. L. D., Sokovi, M. y Ferreira, I.C. F. R (2014). A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(1):42–47.
- Shengbo, G., Wanxi, Peng; Dongli Li; Bo Mo; Minglong, Zhang y Daochun, Qin., (2015) *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 28:1445-1448.
- Shushizadeh, M. R., Behroozi, S., Behfar, A.-A., y Nazemi, M. (2018). Antibacterial Activity and GC-Mass Analysis of Organic Extract from Persian Gulf *Haliclona* sp. *Pharmacophore* 9(2):19–24.
- Song G., y Du, Q. (2012). Structure characterisation of a  $\alpha$   $\beta$ -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *Natural Product Research*, 26(21): 2596–260.1
- Sun, J., He, H. y Xie, B.J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem.* 52(21):6646-52.

- Sun, X. Z.; Liao, Y.; Li, W. y Guo, L. M. (2017). Neuroprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *Neural. Regen. Res.* 12(6):953-958.
- Synytsya, A., Mícková, K., Synytsya, A., Jablonsky, I., Speváček, J., Kováříková, E. y Copíková, J., (2009) Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity 76(4):548-556
- Synytsya, A., y Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers* 92(1): 792-809.
- Synytsya, A., Choi, D., Pohl, R., Na, Y., Capek, P., Lattová, E., Taubner, T., Choi, J., Lee, C., Park, J., Kim, W., Kim, S., Lee, J., y Park Y. (2015). Structural Features and Anti-coagulant Activity of the Sulphated Polysaccharide SPS-CF from a Green Alga *Capsosiphon fulvescens*', *Marine Biotechnology*, 17(6): 718-735.
- Strugała, P., Tronina, T., Huszcza, E. y Gabrielska, J. (2017). Bioactivity *In Vitro* of Quercetin Glycoside Obtained in *Beauveria bassiana* Culture and Its Interaction with Liposome Membranes. *Molecules* 22(9):1520 pp1-20.
- Taofiq, O., Heleno, S., Calhelha, R., Alves, M.J., Barros, L., Gonzáles-Paramás, A., Barreiro, M.F. y Ferreira, I.C.F.R. (2017). *Ganoderma Lucidum*: Uma fonte importante de ingredientes bioativos multifuncionais. In II Congresso das Agrárias. Elvas.
- Teng, B., Wang, C., Zhang, D., Wu, J., Pan, D., Pan, L., Yang, H. y Zhou, P. (2012). 'Hypoglycemic effect and mechanism of a proteoglycan from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 16(2):166-175.
- Tello-Salgado I. (2010). Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional *Ganoderma* (fungi, *ganodermataceae*), conocido como *Reishi* en los mercados internacionales y su relevancia para el desarrollo regional. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus Puebla.
- Tello-Salgado I., Montiel-Arcos E., León-Rivera I. y Martínez-Carrera D.C. (2016). Propiedades funcionales novedosas de *Ganoderma lucidum*: actividad neuroprotectora y anticonvulsiva. Cap 37. pp 811-826 *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México*; Martínez-Carrera, D., Ramírez-Juárez, J., Eds, 856.
- Trigos, A. y Suárez-Medellín, J. (2010). Los hongos como alimentos funcionales y complementos alimenticios. En: *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de*

- producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI. Ed. D. Martínez-Carrera. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Torres-Torres, M.G., Guzmán-Dávalos, L., De Mello y Gugliotta, A. (2012). *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. *Mycotaxon* 121:93-132.
- Venema, D.P., Hollman, P.C.H, Janssen, K.P. y Katan, M.B. (1996). Determination of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid in Foods, Using HPLC with Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* 44 (7):1762–1767.
- Vogt, M., Brüsseler, C., Ooyen, J., Bott, M. y Marienhagen, J. (2016). Production of 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering* 38:436-445.
- Wang, S.Y., Hsu, M.L, Hsu, H.C., Tzeng, C.H., Lee, S.S., Shiao y M.S., Ho, C.K. (1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T. lymphocytes. *Int J Cancer* 70:699-705.
- Wang, C., Lin, D., Chen, Q., Lin, S., Shi, S., y Chen, C. (2018). Polysaccharide peptide isolated from grass-cultured *Ganoderma lucidum* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the human U251 glioma cell line. *Oncology Letters*, 15(4):4330–4336.
- Wang, P. Y., Zhu, X. L. y Lin, Z. B. (2012). Antitumor and Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from Broken-Spore of *Ganoderma lucidum*. *Front Pharmacol* 3:135 pp1-8.
- Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3):258–274.
- Wei, X., LiuX., Yang, J., Fang, J., Qiao H., Zhang, Y. y Yang, J. (2012) Two C-type lectins from shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 27:556-562
- Weissmann, P., Silverman, R. A., Raskin, L.I. (1991). The Role of Salicylic Acid as a Plant Signal Molecule. *Cellular Communication in Plants* 3:15-19.
- Xiao, ZT, Tan, ZY, Ye, Y.C. y He, H.Q. (2010). Comparative study on the yield of different *Ganoderma lucidum* strains. *Guangdong Agr Sci* 37:60–62
- Yamashita, M., Fujii, Y., Ozaki, K., Urano, Y., Iwasa, M., y Nakamura, Y. T. (2015). Human immunodeficiency virus-positive secondary syphilis mimicking cutaneous T-cell lymphoma. *Diagnostic Pathology*, 10(1), 1–6.
- Yang, M., Wang X., Guan, S., Xia, J., Sun, J., Guo, H., y Guo, D. (2007). Analysis of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography

- Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 927–939.
- Ye, L., Liu, S., Xie, F., Zhao, L., y Wu, X. (2018). Enhanced production of polysaccharides and triterpenoids in *Ganoderma lucidum* fruit bodies on induction with signal transduction during the fruiting stage. *PLoS ONE*, 13(4): 1–15.
- Yihuai, G.E, Chan,Y y Shufeng, Z. (2004). Immunomodulating Activities of *Ganoderma*, a Mushroom with Medicinal Properties. *Food Reviews International*, 20(2):123.
- Zhang, Q. (2017). [A new phenethyl alcohol glycoside from *Orobanchae coerulescens*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China Journal of Chinese Materia Medica*, 42(6):1136-1139.
- Zeng, P., Guo, Z., Zeng, X., Hao, C., Zhang, Y., Zhang, M., Liu, Y., Li, H., Li, J., Zhang, L. (2018). Chemical, biochemical, preclinical and clinical studies of *Ganoderma lucidum* polysaccharide as an approved drug for treating myopathy and other diseases in China. *J Cell Mol Med*. 22:3278–3297
- Zhou, X.W., Su, K.Q. y Zhang, M. (2012). Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:941–963.

## 11.1 GLOSARIO

(NOM-248-SSA1-2011, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios; NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios).

**Biofármaco.** A toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas y que reúna las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico.

**Biotecnología.** Se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. Dichos organismos pueden estar o no modificados genéticamente por lo que no hay que confundir Biotecnología con Ingeniería Genética. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico define la biotecnología como la «aplicación de principios de la ciencia y la ingeniería para tratamientos de materiales orgánicos e inorgánicos por sistemas biológicos para producir bienes y servicios; Es la aplicación de técnicas aplicadas a la biología, mediante el uso de organismos vivos, para la generación de bienes y servicios.

**Biotecnología molecular.** Aplicación de recursos técnicos de amplia gama para diseñar y mejorar bioprocesos

**Concentración.** A la cantidad del fármaco presente en el medicamento, expresada en las unidades de medida internacionales. Excepto al medicamento homeopático y al remedio herbolario.

**Dinamización base.** Se refiere al grado de dilución al cual se somete una sustancia activa combinada con diversos aditivos y que generalmente es en proporciones 1/10 (decimal), 1/100 (centesimal), 1/1 000 (milesimal), 1/50 000 (cincuentamilesimal).

**Dispensación.** Es el acto profesional farmacéutico de proporcionar uno o más medicamentos a un paciente de acuerdo con la normatividad vigente y la protección del paciente frente a la posible aparición de problemas relacionados con medicamentos. Además, implica la información al paciente sobre la

medicación que va a utilizar, la detección de situaciones en las que hay un riesgo de sufrir problemas relacionados con los medicamentos y tomar decisiones beneficiosas para el paciente.

**Fármaco.** Toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.

**Fármaco homeopático.** A la sustancia natural o sintética que tenga alguna actividad biológica reportada en las materias médicas homeopáticas o en los trabajos científicos nacionales e internacionales y que se identifique, en su caso, por sus propiedades físicas o químicas, que se presente como tintura madre o en dinamización homeopática y que reúna condiciones para ser empleado como ingrediente de un medicamento homeopático.

**Forma farmacéutica.** A la disposición física que se da a los fármacos y aditivos para constituir un medicamento y facilitar su dosificación y administración.

**Inserto (Instructivo o prospecto).** A la información que en forma escrita y/o gráfica explica al usuario la utilización o cualquier otra información de uso racional del medicamento o remedio herbolario, excepto publicidad.

**Medicamento.** A toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas. Cuando un producto contenga nutrimentos, será considerado como medicamento, siempre que se trate de un preparado que contenga de manera individual o asociada: vitaminas, minerales, electrolitos, aminoácidos o ácidos grasos, en concentraciones superiores a las de los alimentos naturales y además se presente en alguna forma farmacéutica definida y la indicación de uso contemple efectos terapéuticos, preventivos o rehabilitatorios.

**Medicamento alopático,** a toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se



presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas, y se encuentre registrado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para medicamentos alopáticos.

**Medicamento biotecnológico.** A toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas.

**Medicamento biotecnológico biocomparable.** Al medicamento biotecnológico no innovador que demuestre ser biocomparable en términos de seguridad, calidad y eficacia al medicamento biotecnológico de referencia a través de las pruebas que establezca la Ley General de Salud, el Reglamento de Insumos para la Salud y demás disposiciones aplicables.

**Medicamento biotecnológico innovador.** Medicamento biotecnológico que obtenga el registro sanitario en México, así reconocido por la Secretaría.

**Medicamento genérico.** Especialidad farmacéutica con el mismo fármaco o sustancia activa y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que utiliza la misma vía de administración y que mediante las pruebas reglamentarias requeridas, ha comprobado que sus especificaciones farmacopeas, perfiles de disolución o su disponibilidad u otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a las del medicamento de referencia.

**Medicamento herbolario.** Producto elaborado con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional.