



Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México

Preliminary study of antioxidant activity of three species of *Ganoderma* genus (Polyporaceae) native of Hidalgo State, México

Miguel Ángel Islas-Santillán¹, Araceli Castañeda Ovando², Antonio Álvarez Delgadillo¹, Ricardo Valenzuela Garza³, Leticia Romero-Bautista¹, J. Martín Torres-Valencia⁴

¹ Laboratorio de Etnobotánica. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México.

² Laboratorio de Físico-química de Alimentos II. Área Académica de Química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. ³ Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Ciudad de México. ⁴ Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México.

Miguel Ángel Islas Santillán, e-mail: miguel.islass@gmail.com

RESUMEN

Antecedentes: El metabolismo produce radicales que dañan células y biomoléculas, promoviendo peroxidación lipídica, envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas. El género *Ganoderma* posee metabolitos con actividad antioxidante, anticancerígena, antitumoral y antiinflamatoria.

Objetivo: Comparar la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles de extractos etanólicos y acuosos (basidiomas, micelio) de tres especies de *Ganoderma* del estado de Hidalgo.

Métodos: La capacidad antioxidante se evaluó con el método ABTS y los fenoles totales con el método Folin-Ciocalteu. Se analizó la varianza (ANOVA), pruebas de Tukey y análisis discriminante generalizado lineal (AFDG).

Resultados y conclusiones: Existieron diferencias significativas entre extractos acuosos y etanólicos, la mayor actividad antioxidante ocurrió en extractos etanólicos de *G. brownii*, *G. applanatum* (GaA-b) y *G. curtisii* (GcZ-b), y en acuosos de *G. brownii*, *G. applanatum* (GaA-m) y *G. curtisii* (GcA-m); *G. brownii* (GbT-m) mostró mayor actividad. El análisis AFDG, determinó 77.96% de varianza en la primera función discriminante por capacidad antioxidante y polifenoles de extractos etanólicos, y 20.07% en la segunda por correlación de fenoles de ambos extractos y antioxidantes en acuosos. Los resultados indican que la actividad antioxidante se asocia a la presencia de fenoles, polisacáridos y esteroles, variando según la especie, etapa de desarrollo, extracto y lugar de colecta.

Palabras clave: radical libre, ABTS, esteroles, polifenoles/fenoles

ABSTRACT

Background: Metabolism produce free radicals, which damage cells and biomolecules, causing lipid peroxidation, aging process and chronic degenerative diseases. The genus *Ganoderma* has metabolites with antibacterial, anti-cancer, anti-tumor, anti-inflammatory and antioxidant activities.

Objective: Compare antioxidant capacity and total polyphenols content of ethanolic and aqueous extracts (basidiomes and mycelium) of three species of *Ganoderma* from Hidalgo State.

Methods: Antioxidant capacity was evaluated by the ABTS method and total polyphenols content by the Folin-Ciocalteu method. Statistical tests included variance analysis (ANOVA), Tukey test and generalized linear discriminant analysis (AFDG).

Recibido / Received: 20/04/2017

Aceptado / Accepted: 15/12/2017

Results and conclusions: Significant differences were observed between aqueous and ethanolic extracts, the highest activity happened in ethanolic extracts of *G. brownii*, *G. applanatum* (GaA-b) and *G. curtisii* (GcZ-b) and aqueous extracts of *G. brownii*, *G. applanatum* (GaA-m) and *G. curtisii* (GcA-m), the most active was *G. brownii* (GbT-m). The AFDG analysis explained 77.96% of the variance in first discriminant function by antioxidant capacity and phenols present in ethanolic extracts and 20.07% in second function correlating phenols of both extracts and antioxidants in aqueous extracts. These results show that antioxidant activity is determined by the presence of phenols, polysaccharides and sterols, varying according to the species, stage of development, extract and collection area.

Key words: free radical, ABTS, sterols, polyphenols/phenols

INTRODUCCIÓN

Como resultado del metabolismo, algunos organelos celulares como mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, membrana nuclear, citoplásmica y retículo endoplásmico originan radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ROS): superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^\cdot), peróxido ($R-OO^\cdot$), alcoxilo (RO^\cdot) e hidroperóxido (HOO^\cdot) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS): óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2) y peróxido de nitrato (Maldonado *et al.*, 2010). Sin embargo, éstos también pueden generarse por factores externos como contaminación ambiental, exposición a radiación y productos químicos como medicamentos, aditivos alimenticios, pesticidas, herbicidas y tabaco, entre otros.

Estos radicales atacan moléculas como aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para contrarrestar su efecto, las células han desarrollado mecanismos de protección y reparación del daño, como la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH-quinona oxidoreductasa y epóxido hidrolasa (Finkel y Holbrook, 2000) y de metabolitos antioxidantes que atrapan y neutralizan los radicales libres; sin embargo, resultan insuficientes para protegerlas completamente (Smina *et al.*, 2011).

Cuando los oxidantes superan la cantidad de antioxidantes ocurre un estrés oxidativo, que provoca daños importantes en biomoléculas y componentes celulares (Halliwell, 1996), lo cual está asociado con enfermedades crónicas degenerativas como Alzheimer, Parkinson, arteriosclerosis, cáncer, artritis, desórdenes neurodegenerativos, enfermedades coronarias y envejecimiento, entre otras (Yoshikawa *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2008; Badarinath *et al.*, 2010; Kozarski *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior, es importante la búsqueda de productos naturales con propiedades antioxidantes que al incluirse en la dieta diaria contribuyan a mantener la salud, al prevenir y curar

enfermedades, siendo interesante el estudio de especies fúngicas que poseen potencial medicinal. Existen varios hongos medicinales entre ellos los del género *Ganoderma* que tienen agentes antioxidantes como polifenoles, terpenoides, triterpenos y esteroides (Smina *et al.*, 2011), como el ergosterol y sus derivados que reducen la peroxidación lipídica (Kobori *et al.*, 2007) y poseen propiedades antitumorales y anticancerígenas (Wasser y Weis, 1997).

Ganoderma es un género lignícola que crece en ambientes tropicales causando pudrición blanca de duramen y raíz especialmente en latifoliadas y algunas coníferas (Cibrián-Tovar *et al.*, 2007), entre ellas *Quercus* spp., *Ulmus* spp., *Acer* spp., *Fraxinus* spp., *Acacia* spp., *Populus* spp., *Macadamia* spp., *Abies* spp., *Tsuga* sp., *Cocos nucifera*, *Areca catechu*, *Prunus persica*, *Pyrus communis*, *Paullinia cupana*, *Vitis* spp. y *Coffea* spp. (Sánchez, 1980; Ariffin *et al.*, 2000; Stamets, 2000; Pilotii *et al.*, 2004; Alvarado-Rosales *et al.*, 2007).

Entre los trabajos sobre actividad antioxidante para el género *Ganoderma*, destacan los de Mau *et al.* (2005a,b) y Tseng *et al.* (2008) que evaluaron extractos acuosos y metanólicos, así como compuestos polisacáridos de basidiomas de *G. tsugae*; Chen *et al.* (2008) realizaron pruebas con polisacáridos de basidiomas de *G. atrum*; Saltarelli *et al.* (2009) cuantificaron la actividad del micelio de *G. lucidum*; Kalyoncu *et al.* (2010) con el micelio de 21 especies silvestres incluyendo *G. lucidum*; Smina *et al.* (2011) probaron la fracción triterpénica de *G. lucidum* con diferentes métodos *in-vitro* e *in-vivo*; Kozarski *et al.* (2011) con la fracción polisacárida de cuatro hongos medicinales incluido *G. lucidum*; Čilerdžić *et al.* (2014) evaluaron basidiomas cultivados de *G. lucidum* mientras que Nagaraj *et al.* (2014) y Acharya *et al.* (2015) los basidiomas silvestres de *G. applanatum*.

Singdevsachan *et al.* (2015) compararon la composición química y actividad de *G. applanatum*, *G. lipsiense*, *G. chal-*



ceum y *G. tsugae*. Por otra parte, Tamrakar *et al.* (2016) estudiaron 62 especies de hongos silvestres de Nepal incluidas cuatro de *Ganoderma*. Para México destaca el trabajo de Garza *et al.* (2006) que investigaron la actividad biológica de extractos acuosos de cuatro especies fúngicas del noreste de México incluyendo *G. applanatum* y el de Huerta *et al.* (2016) que estimaron la actividad de extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de basidiomas silvestres de *G. curtisii* del estado de Michoacán. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la composición química y actividad biológica de especies de *Ganoderma* nativas de México, que confirmen las propiedades atribuidas a este género.

El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales presentes en extractos etanólicos y acuosos de basidiomas y micelio de *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, procedentes de tres localidades del estado de Hidalgo, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de material biológico

Se recolectaron basidiomas maduros de *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii* en bosques templados de tres localidades del Estado de Hidalgo (Tabla 1). Los ejemplares fueron identificados siguiendo técnicas convencionales de taxonomía (Largent, 1973; Largent *et al.*, 1977; Gilbertson y Ryvarden, 1986; Ryvarden, 1991) y las claves de identificación para el género propuestas por Ryvarden y Gilbertson (1993), Cibrian-Tovar *et al.* (2007) y Torres *et al.* (2015); posteriormente fueron deshidratados a temperatura ambiente en oscuridad. Un espécimen de cada especie se depositó en la colección de hongos “Dr. Gastón Guzmán Huerta” del herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional, con los números de registro IslasGA10, IslasGA14, IslasGAB20, IslasGCT36, IslasGCZ28 (Tabla 2).

Tabla 1. Localidades de recolecta de basidiomas de *Ganoderma* spp.

Localidad	Municipio	Vegetación	Altitud (msnm)	Ubicación Geográfica
Los Reyes	Acaxochitlán	BQP	2252	20° 09' 17"; 98° 09' 52"
Cuatempa	Tlanchinol	BMM	1474	20° 59' 04"; 98° 37' 28"
La Mojonera	Zacualtipán	BF	2012	20° 37' 82"; 98° 36' 91"

BQP (bosque de *Quercus-Pinus*), BMM (bosque mesófilo de montaña), BF (bosque de *Fagus*).

Tabla 2. Listado de muestras utilizadas en la preparación de extractos

Especie	Procedencia	Muestra	Clave Herbario/cepario	Clave de muestra
<i>G. curtisii</i>	Acaxochitlán	Basidioma (silvestre)	IslasGA14	GcA-b
		Basidioma (cultivado)		GcA-bc
		Micelio (cepa)	UAEH0017	GcA-m
<i>G. curtisii</i>	Tlanchinol	Basidioma (silvestre)	IslasGCT36	GcT-b
<i>G. curtisii</i>	Zacualtipán	Basidioma (silvestre)	IslasGCZ28	GcZ-b
<i>G. brownii</i>	Tlanchinol	Basidioma (silvestre)	IslasGAB20	GbT-b
		Micelio (cepa)	UAEH0026	GbT-m
<i>G. applanatum</i>	Acaxochitlán	Basidioma (silvestre)	IslasGA10	GaA-b
		Micelio (cepa)	UAE0030	GaA-m

b= basidioma silvestre, bc= basidioma cultivado, m= micelio.

Cultivo en laboratorio

Se realizaron aislamientos somáticos a partir de basidiomas silvestres (IslasGA14, IslasGAB20, IslasGA10), en cajas Petri con medio malta-peptona-levadura-agar (MYPA) (Shoji, 1999; Postemsky *et al.*, 2006) suplementado con benomil (3 ppm) y aureomicina (10 ppm) para prevenir crecimiento de contaminantes (Stalpers, 1978). Las cepas obtenidas se registraron con las claves UAEH0018 (*G. curtisii*), UAE0019 (*G. applanatum*) y UAEH0020 (*G. brownii*) (Tabla 2). Posteriormente se propagaron en medio líquido malta-levadura-peptona (MYP) a 25 °C durante 15 días, el micelio obtenido se lavó con agua y se secó a temperatura ambiente en oscuridad. La cepa UAEH0018 (*G. curtisii*) se cultivó en aserrín de encino suplementado con salvado, en bolsas de 2 kg que se incubaron a 25 °C durante 1 mes. Una vez invadidas se inició el riego y la fructificación, transcurridos 3 meses se recolectaron los basidiomas y se deshidrataron a temperatura ambiente en oscuridad.

Preparación de extractos

Todas las muestras deshidratadas se molieron manualmente. Para los extractos etanólicos se colocaron 2 g de muestra en 100 mL de etanol durante 24 h con agitación magnética en oscuridad, se filtró y aforó a 100 mL con etanol. En los extractos acuosos se preparó una infusión con 2 g de muestra en 100 mL de agua destilada en ebullición, de igual forma se filtró y aforó a 100 mL.

Pruebas antioxidantes

Ensayo ABTS. La capacidad antioxidante se evaluó con el método de ABTS (Re *et al.*, 1999), el radical ABTS*[•] se obtiene mediante la reacción de una solución stock de ABTS ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (Sigma) 7 mM (19.4 mg) con persulfato potásico 2.45 mM (3.3. mg) en 5 mL de agua desionizada, la solución se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente por 16 h antes de su uso. Posteriormente se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.60 (±0.1) a una longitud de máxima absorción de 734 nm. La curva de calibración se realizó con una solución estándar de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) 1mM (2.5 mg en 10 mL de etanol) a partir de la cual se obtuvieron concentraciones en un intervalo de 10–50 µM. Los extractos a

evaluar se diluyeron con etanol en una proporción 1:10 y 1:5, se colocaron 100 µL de cada muestra en una celda espectrofotométrica y se adicionaron 1000 µL de ABTS*[•], las lecturas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro marca Jenway 6405UV/Vis a una absorbancia de 734 nm durante 10 min, los resultados se expresaron en mg equivalentes Trolox por gramo de muestra (mg Trolox/g).

Contenido de fenoles totales. La cuantificación de fenoles totales se realizó con el método de Folin Ciocalteu (F-C) (Singleton, *et al.*, 1999), utilizando como buffer Na₂CO₃ al 4%, la curva de calibración se hizo utilizando como estándar una solución de ácido gálico 2.5 µM (10 mg en 10 mL de agua destilada) a partir de la cual se prepararon concentraciones en un intervalo de 20–100 µM. En un matraz se colocó 1 mL de muestra, 1 mL de reactivo de Folin (Sigma), 4 mL de solución de Na₂CO₃ y se aforó a 10 mL con agua destilada, se calentó a 50 °C en baño María por 10 min y se midió la absorbancia por triplicado a 765 nm. Las muestras se analizaron de igual forma sustituyendo el patrón de ácido gálico por 1 mL del extracto a evaluar. Los resultados promedio de las lecturas se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g).

Los datos se estandarizaron mediante la siguiente fórmula:

$$CR = \frac{\left(\frac{A-b}{m}\right) * PM}{C} = \frac{\text{mg de referencia}}{\text{g de muestra}}$$

En donde CR= concentración del referente, A= absorbancia, m= pendiente de la curva patrón, b= ordenada al origen de la curva patrón, PM= peso molecular del compuesto de referencia (g/mol) y C= concentración de la muestra (g/mL).

Los datos resultantes se evaluaron con un análisis de varianza (ANOVA) y se compararon las medias con una prueba de Tukey (p < 0.05). Así mismo, se realizó un análisis discriminante generalizado lineal (AFDG), con los datos de actividad antioxidante expresados en mg Trolox/g de muestra y con la concentración de fenoles totales en mg EAG/g de muestra.

RESULTADOS

Actividad antioxidante

Para los extractos etanólicos se formaron tres grupos con la prueba de Tukey, la mayor capacidad antioxidante se observó



en *Ganoderma brownii* (GbT-b y GbT-m con 68.54 y 67.82 mg Trolox/g respectivamente), *G. applanatum* (GaA-b con 67.53 mg Trolox/g), *G. curtisii* (GcZ-b con 66.38 mg Trolox/g) y *G. curtisii* (GcA-b con 64.94 mg Trolox/g); y la menor en *G. curtisii* (GcA-bc y GcA-m con 47.82 y 50.41 mg Trolox/g) (Figura 1).

En los extractos acuosos se integraron cuatro grupos con la prueba de Tukey los valores más altos se obtuvieron en basidiomas de *G. curtisii* (GcA-m con 67.96 mg Trolox/g), *G. brownii* (GbT-b con 66.81 mg Trolox/g), *G. curtisii* (GcA-m con 66.387 mg Trolox/g) y *G. brownii* (GbT-m con 65.24 mg Trolox/g); los valores más bajos se observaron en *G. curtisii* (GcA-b y GcA-bcm con 56.45 y 59.76 mg Trolox/g) (Figura 1).

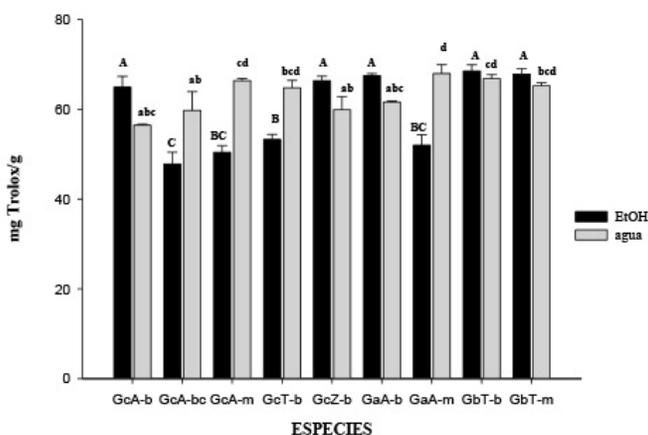


Figura 1. Actividad antioxidante de los extractos crudos de *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, el valor promedio (n=3) se expresa en mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mg Trolox/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha = 0.05$), mayúsculas para extractos etanólicos y minúsculas para acuosos.

Cuantificación de fenoles

La prueba de Tukey permitió diferenciar siete grupos para los extractos etanólicos y nueve para los acuosos (Figura 2). La mayor cantidad de fenoles totales se determinó en extractos etanólicos de *G. brownii* (GbT-m con 100.33 mg EAG/g) y *G. applanatum* (GaA-b con 61.36 mg EAG/g) y los valores más bajos en *G. curtisii* (GcA-m y GcA-b con 13.57 y 19.09 mg

EAG/g, respectivamente). En los extractos acuosos, los valores máximos fueron para *G. curtisii* (GcA-bc con 146.64 mg EAG/g), *G. brownii* (GbT-b con 104.37 mg EAG/g) y *G. curtisii* (GcA-m con 96.65 mg EAG/g) y los valores más bajos para *G. applanatum* (GaA-m), *G. curtisii* (GcT-b) y *G. applanatum* (GaA-b con 47.76, 55.11 y 58.79 mg EAG/g respectivamente) (Figura 2).

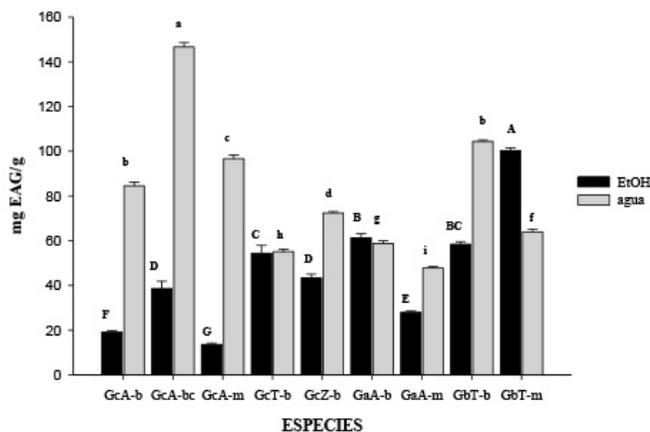


Figura 2. Cuantificación de fenoles totales en los extractos crudos de *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g). Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($\alpha = 0.05$), mayúsculas para extractos etanólicos y minúsculas para acuosos.

Para comprobar la relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, se realizó una prueba de correlación para los extractos etanólicos y acuosos por separado, observándose correlación positiva en los extractos etanólicos ($R^2=0.280$ y $P=0.004$); sin embargo para los extractos acuosos no hubo correlación ($R^2=0.072$ y $P=0.173$).

En el análisis de ANOVA anidado se obtuvo un efecto significativo ($P < 0.0001$) de la localidad (solvente) y especie (localidad-solvente) sobre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante; sin embargo, no se observó un efecto significativo por sí solo del solvente utilizado para obtener los extractos en las variables, sino en la interacción (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de ANOVA anidada de los extractos etanólicos y acuosos de *Ganoderma* spp.

FACTOR	gl	SC	F	P
localidad {solvente}	4	487.71	36.48	<0.0001
especie {localidad, solvente}	12	1696.42	42.3	<0.0001
solvente	1	3.24	0.97	0.33

En el análisis discriminante generalizado AFDG de la actividad antioxidante y de fenoles totales, se obtuvo que el 77.96% de la varianza se explica por el contenido de fenoles de los extractos etanólicos mg EAG/g ($r=-0.033$) y por los mg Trolox/g de los extractos etanólicos ($r=-0.325$) en la primera función discriminante (FD1). Por otra parte, para la segunda función discriminante (FD2) las variables que más se correlacionaron fueron fenoles de los extractos etanólicos mg EAG/g ($r=0.558$), fenoles y antioxidantes de los extractos acuosos ($r=0.051$ y $r=-0.193$, respectivamente) con lo cual se explicó el 20.07% de la variación total (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de función discriminante que muestra la correlación de las variables con las funciones discriminantes, valores propios, significancia (P) y porcentaje de varianza (%)

Variable	FD 1	FD 2
Fenoles acuoso	0.867	0.151
Fenoles etanólico	-0.033	0.559
Antioxidante etanólico	-0.326	0.014
Antioxidante acuoso	0.027	-0.194
Valores propios	1058.54	272.56
P	<0.0001	<0.0001
% Varianza	77.96	20.07

En este análisis se establecieron cinco grupos, en el primero se encuentra *G. brownii* (GbT-m) con el mayor contenido de polifenoles etanólicos; el segundo grupo integrado por *G. curtisii* (GcT-b y GcZ-b) y *G. applanatum* (GaA-b) que exhiben una capacidad antioxidante intermedia para los extractos acuosos (54 mg Trolox/g); en el tercer grupo se ubica *G. brownii* (GbT-b)

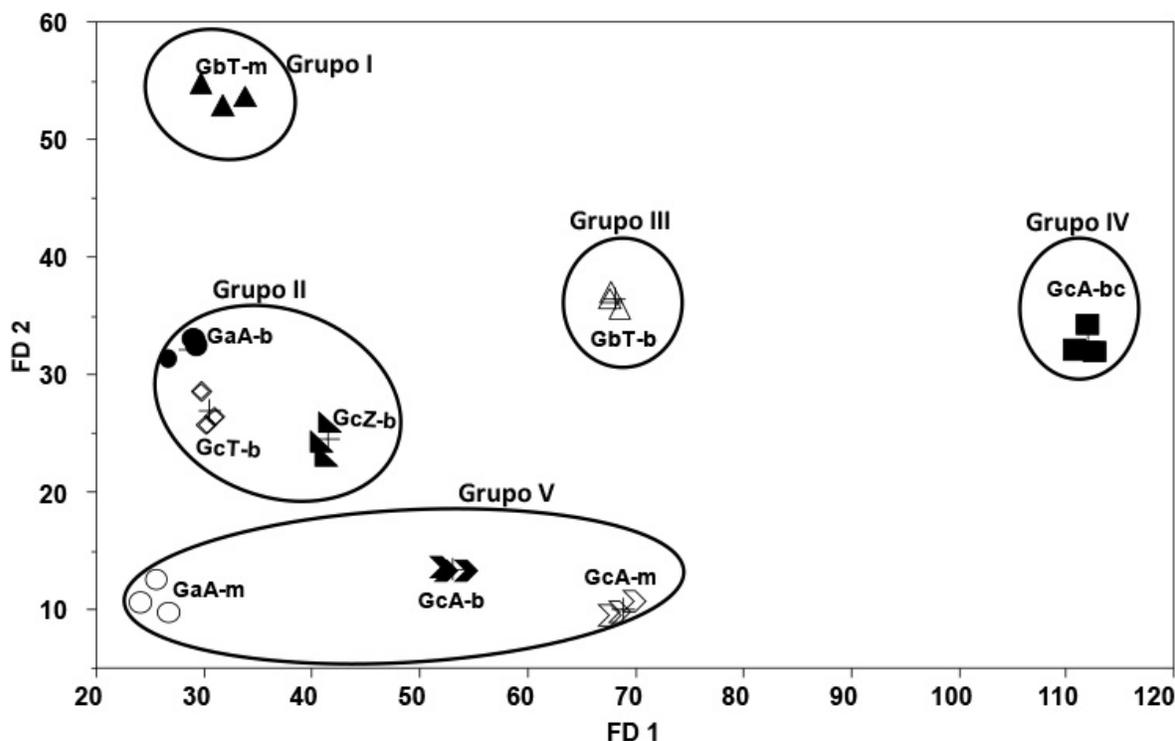


Figura 3. Análisis discriminante generalizado lineal (AFDG) de la actividad antioxidante de los extractos de *Ganoderma* spp. Grupo 1: *G. brownii* micelio (GbT-m), grupo 2: *G. curtisii* basidioma (GcT-b y GcZ-b) y *G. applanatum* basidioma (GaA-b); grupo 3: *G. brownii* basidioma (GbT-b); grupo 4: *G. curtisii* basidioma cultivado (GcA-bc) y grupo 5: *G. curtisii* micelio (GcA-m) y basidioma (GcA-b) y *G. applanatum* micelio (GaA-m).



con una proporción intermedia en polifenoles y capacidad antioxidante de la fracción etanólica pero una mayor cantidad de polifenoles en la fracción acuosa (104.37 mg EAG/g); en el cuarto grupo con una menor actividad se encuentra *G. curtisii* (GcA-bc) con menor cantidad de polifenoles y capacidad antioxidante baja en los extractos etanólicos, sin embargo, contiene la mayor cantidad de polifenoles en los extractos acuosos (146.65 mg EAG/g); y el quinto grupo conformado por *G. curtisii* (GcA-b, GcA-m) y *G. applanatum* (GaA-m) con los valores de polifenoles más bajos para los extractos etanólicos (Figura 3).

DISCUSIÓN

Se analizaron nueve muestras correspondientes a tres especies silvestres en dos etapas de desarrollo: cinco basidiomas silvestres y uno cultivado, además de tres en fase miceliar, todas originarias de tres localidades del estado de Hidalgo, México. El propósito de comparar dos disolventes de alta polaridad (agua y etanol) fue demostrar si existía un efecto en la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de las muestras, debido a que el consumo tradicional de basidiomas del género *Ganoderma* es principalmente mediante infusiones y tinturas.

Los extractos acuosos de *G. curtisii* (GcT-b, GcA-m y GcA-bc) y *G. applanatum* (GaA-m) mostraron mayor actividad antioxidante que los extractos etanólicos, lo que corresponde con lo reportado para *G. lucidum* (Kalyoncu *et al.*, 2010) y *G. tsugae* (Mau *et al.*, 2005 a,b). Sin embargo, difiere en *G. brownii* (GbT-by Gb), *G. curtisii* (GcZ-b y GcA-b) y *G. applanatum* (GaA-b), que mostraron una mayor actividad en los extractos etanólicos en relación con los acuosos, lo que es similar a lo reportado para *G. applanatum*, *G. chalconum* y *G. tsugae* (Singdevsachan, *et al.*, 2015).

El contenido de fenoles totales en las muestras analizadas de *Ganoderma*, fue mayor a lo reportado para algunos hongos comestibles en extractos hidroalcohólicos de *Agaricus bisporus* (19.97 mg EAG/g), *Pleurotus eryngii* (12.74 mg EAG/g), *Lentinula edodes* (10 mg EAG/g) y *Pleurotus ostreatus* (16.05 mg EAG/g) (Penzete *et al.*, 2012) y en extractos metanólicos de *Agaricus bisporus* variedad blanca y café (23.34 y 37.33 mg EAG/g), *Pleurotus ostreatus* (12.54 mg EAG/g), *Pleurotus eryngii* (7.14 mg EAG/g) y *Lentinula edodes* (8.84 mg EAG/g) (Reis *et al.*, 2012). La cantidad de polifenoles de los extractos etanó-

licos de basidiomas de *G. curtisii* cultivado (GcA-bc) y basidiomas silvestres de *G. curtisii* (GcZ-b y GcT-b) corresponden con lo obtenido para extractos hidroalcohólico y etanólico de *G. curtisii* (35.63 mg EAG/g y 49.1 mg EAG/g) (Huerta *et al.*, 2016) y para extractos etanólicos de *G. lucidum* (33-52 mg EAG/g) (Ćilerdžić *et al.*, 2014). Para *G. applanatum* se observó que el contenido de fenoles en los extractos etanólico y acuoso (61.36 y 58.79 mg EAG/g) es análogo a lo reportado en trabajos similares entre 47 y 71 mg (Kozarski *et al.*, 2011; Nagaraj *et al.*, 2014).

Al comparar el extracto acuoso del micelio de *G. curtisii*, se obtuvo que la concentración de 96.65 mg EAG/g, fue mayor a lo encontrado para micelio de *G. tsugae* (41.3 mg EAG/g) (Mau *et al.*, 2005b) a diferencia del extracto etanólico que tuvo una concentración de 13.57 mg EAG/g, menor a lo reportado para el extracto metanólico de *G. tsugae* (35.6 mg EAG/g) (Mau *et al.*, 2005a) y para extractos hidroalcohólicos de dos cepas de *G. lucidum* (Italia y China) con valores de 27.9 y 16.5 mg equivalentes de ácido cafeico/g, respectivamente (Saltarelli *et al.*, 2009).

La actividad antioxidante se ha relacionado con la presencia de compuestos de bajo peso molecular (fenoles) responsables de capturar radicales libres (Gursoy *et al.*, 2009). Sin embargo, también contribuyen los triterpenos (Smina *et al.*, 2011) y polisacáridos de alto peso molecular, como se demostró en pruebas con *G. tsugae* (Tseng *et al.*, 2008) y *G. curtisii* (Saltarelli *et al.*, 2009), estos compuestos además poseen propiedades reguladoras del sistema inmune, anti-radiación, anti-coagulantes, anti-cáncer, anti-HIV e hipoglucémicas (Lee *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). De igual forma, se conoce que los microesteroles como el ergosterol y sus derivados, contribuyen a inhibir la peroxidación lipídica (Kobori *et al.*, 2007).

Las diferencias en las muestras analizadas indican que la concentración de metabolitos secundarios (polisacáridos, triterpenos, fenoles y esteroides) puede variar dependiendo de la especie y etapa de desarrollo. Se observó que los basidiomas maduros de las especies no laqueadas (*G. brownii* y *G. applanatum*) presentaron mayor actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos que las laqueadas (*G. curtisii*). La variación existente entre las dos etapas de desarrollo pudiera deberse a que el micelio (fase inmadura) se conforma de hifas generativas y esqueléticas que producen enzimas lignolíticas como oxidasas

y peroxidadas (lacasas, lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa) para colonizar el sustrato (Arboleda y Mejía, 2010), mientras que los basidiomas al ser estructuras especializadas en donde se forman las esporas tienen mayor cantidad de triterpenos y polisacáridos. Así mismo, se observó que el disolvente utilizado y la temperatura de extracción influyeron en la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles dependiendo de la especie y etapa desarrollo. De igual forma, los factores bióticos y abióticos de las localidades de recolecta pudieran influir en la composición química de las muestras, sin embargo no se analizaron a profundidad, por lo que sería conveniente realizar un estudio complementario. En este estudio preliminar se destaca el potencial antioxidante que tienen las cepas nativas de *Ganoderma* spp. del estado de Hidalgo con resultados promisorios que motivan la realización de investigaciones futuras enfocadas a la biotecnología y biomedicina.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) la beca otorgada a Miguel Ángel Islas Santillán para la realización del Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, y por el financiamiento parcial (proyecto CB-2014 No. 238206).

LITERATURA CITADA

- Acharya, K., P. Yonzon, M. Rai, R. Acharya, 2005. Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Ganoderma applanatum*. *Indian Journal of Experimental Biology* 43: 926-929.
- Álvarez, E., O. Jiménez, C. Posada, B. Rojano, J. Gil, C. García, 2008. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *Vitae* 15: 165-172.
- Alvarado-Rosales, D., L. de L. Saavedra-Romero, A. Almaraz-Sánchez, B. Tlapal-Bolaños, O. Trejo-Ramírez, J.M. Davidson, J.T. Klijunus, S. Oak, J.G. O'Brien, F. Orozco-Torres, D. Quiroz-Reygadas, 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos en México. *Polibotánica* 23: 1-21.
- Arboleda, C., A.I. Mejía, 2010. Inducción de la actividad de lacasa en *Ganoderma* sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia* 44: 519-532.
- Ariffin, D., A.S. Idris, G. Singh, 2000. Status of *Ganoderma* in oil palm. In: Flood, J., P.D. Bridge, M. Holdernes (eds.), *Ganoderma* diseases of perennial crops. CABI Publishing. Londres. Pp. 49-68.
- Badarinath, A., K.M. Rao, C.M.S. Chetty, S. Ramkanth, T. Rajan, K.A. Gnanaprakash, 2010. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of Pharm Tech Research* 2: 1276-1285.
- Chen, Y., X. Ming-Yong, N. Shao-Ping, L. Chang, W. Yuan-Xing, 2008. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry* 1: 231-241.
- Cibrián-Tovar, D., D. Alvarado-Rosales, S.E. García-Díaz (Eds.), 2007. Enfermedades forestales en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Čilerdžić, J., J. Vukojević, M. Stajić, T. Stanojković, J. Glamočlija, 2014. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology* 155: 312-319.
- Finkel, T., N.J. Holbrook, 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408: 239-247.
- Garza, L., X.S. Ramírez, F. Garza, M.C. Salinas, N. Waksman, Y. Alcaráz, O. Torres, 2006. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. *Ciencias Universidad Autónoma de Nuevo León* 9: 164-170.
- Gilbertson, R.L., L. Ryvarden, 1986. North American Polypores. Volume 1: *Abortiporus - Lindtneria*. 433 S., 209 Abb. Oslo Fungiflora A/S.
- Gursoy, N., C. Sarikürkücü, M. Cengiz, M.H. Solak, 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food and Chemical Toxicology* 47: 2381-2388.
- Halliwell, B., 1996. Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radical Research* 25: 57-74.
- Huerta, I., J. Molina, M.G. Garnica, B. Yahuaca, 2016. Total polyphenols and antioxidant activity of *Ganoderma curtisii* extracts. *Journal of Medicinal Plants Studies* 4: 136-141.
- Kalyoncu, F., M. Oskay, K. Hüsnüye, 2010. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology* 1: 195-199.
- Kobori, M., M. Yoshida, M. Ohnishi-Kameyama, H. Shinmoto, 2007. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW26.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology* 150: 209-219.
- Kozarski, M., A. Klaus, M. Niksic, D. Jakovljevic, J.P.F.G. Helsper, L.J.L.D. Van Griensven, 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129: 1667-1675.
- Largent, D.L., 1973. How to identify mushrooms to genus I: Macroscopic Features. Mad River Press Inc. Eureka, California.
- Largent, D.L., D. Johnson, R. Watling, 1977. How to identify mushrooms to genus III: Microscopic Features. Primera edición. Mad River Press Inc. Eureka, California.
- Lee, I.H., R.L. Huang, C.T. Chen., H.C. Chen, W.C. Hsu, M.K. Lu, 2002. *Antrodia camphorate* polysaccharides exhibit antihepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters* 209: 61-65.
- Maldonado, O., E.N. Jiménez, M.R.B. Guapillo, G.M. Ceballos, E. Méndez, 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 10 (2): 32-39.
- Mau, J.L., S.Y. Tsai, Y.H. Tseng, S.J. Huang, 2005a. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 93: 641-649.
- Mau, J.L., S.Y. Tsai, Y.H. Tseng, S.J. Huang, 2005b. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT-Food Science and Technology* 38: 589-597.
- Nagaraj, K., N. Mallikarjun, R. Naika, T.M. Venugopal, 2014. Antioxidative activities of wild macro fungi *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 7: 166-171.
- Penzete, G., A. Assunção, G.C. Dos Santos, A. Bracht, C. Giatti, C. Gandolfi, R. Marina, 2012. Antioxidant properties of the most common edible mushrooms consumed in Brazil. In: Andres S.,



- Baumann N. (eds.), *Musrooms: types, properties and nutrition*. Nova Science Publishers Inc. New York. Pp. 285-295.
- Pilotti, C.A., F.R. Sanderson, E. Aitken, W. Armstrong, 2004. Morphological variation and host range of two *Ganoderma* species from Papua New Guinea. *Mycopathologia* 158 (2): 151-265.
- Postemsky, P., D. Figlas, S. Delmastro, R. Devalis, N. Curvetto, 2006. Optimizing *Grifola sordulenta* and *Grifola gargal* growth in agar and liquid nutrient media. *Micología Aplicada Internacional* 18: 7-12.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice Evans, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Reis, F.S., A. Martins, L. Barros, I.C.F.R. Ferreira, 2012. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1201-1207.
- Ryvarden, L., 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5. Fungiflora, Oslo.
- Ryvarden, L., 2000. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* 92: 181-191.
- Ryvarden, L., R.L. Gilbertson, 1993. *European Polypores, Part 1: Abortiporus-Lindtneria*. *Synopsis Fungorum* 6. Fungiflora, Oslo.
- Saltarelli, R., P. Ceccaroli, M. Lotti, A. Zambonelli, M. Buffalini, L. Casadei, L. Vallorani, V. Stocchi, 2009. Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry* 116: 143-151.
- Sánchez, R., 1980. Macromicetos patógenos y destructores de la madera de los bosques de la Meseta Tarasca, Michoacán. *Revista Ciencia Forestal* 5: 4-19.
- Shoji, O., 1999. Effect of water potencial on fruitbody formation of *Lentinula edodes* in sawdust-based substrate. *Journal of Wood Science* 45: 337-342.
- Singdevsachan, S.K., J.K. Patra, K. Tayung, H. Thatoi, 2015. Chemical constituents, antioxidative and antibacterial properties of medicinal mushrooms collected from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 87: 559-570.
- Singleton, V.L., R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Smima, T.P., J. Mathew, K.K. Janardhanan, T.P.A. Devasagayam, 2011. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32: 438-446.
- Stalpers, J.A., 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Studies in Mycology* 16: 1-248.
- Stamets, P., 2000. *Growing gourmet and medicinal mushroom*. 3ª. Edition. Ten Speed Press, Olympia, WA. Berkeley, California.
- Tamrakar, S., H.B. Tran, M. Nishida, S. Kaifuchi, H. Suhara, K. Doi, K. Fukami, G.P. Parajuli, K. Shimizu, 2016. Antioxidative activities of 62 wild mushrooms from Nepal and the phenolic profile of some selected species. *Journal of Natural Medicine* 70 (4): 769-779.
- Torres-Torres, M.G., L. Ryvarden, L. Guzmán-Dávalos, 2015. *Ganoderma* subgénero *Ganoderma* en México. *Revista Mexicana de Micología* 41: 27-45.
- Tseng, Y.H., J.H. Yang, J.L. Mau, 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 107 (2): 732-738.
- Wasser, S.P., A.L. Weis, 1997. Medicinal mushrooms. In: Nevo, E. (ed.), *Reishi mushroom (Ganoderma lucidum, (Curtis: Fr.), P. Karst)*, Peledfus Public House, Haifa. Pp. 1-39.
- Yang, J.H., Y.M. Du, R.H. Huang, L.P. Sun, H. Liu, X.H. Gao, 2005. Chemical modification and antitumor activity of Chinese laccifer polysaccharide from lac tree *Rhus vemicifera*. *Carbohydrate Polymers* 59: 101-107.
- Yoon, S. J., M.A. Yu, Y.R. Pyun, J.K. Hwang, D.C. Chu, L.R. Juneja, 2003. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharides with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research* 112: 151-158.
- Yoshikawa, T., S. Toyokuni, Y. Yamamoto, Y. Naito, 2000. *Free Radicals in Chemistry Biology and Medicine*. OICA International, Londres.