

ESTEROLES PRINCIPALES DE *Ganoderma curtisii* Y *Ganoderma applanatum* DEL ESTADO DE HIDALGO, MÉXICO

MAIN STEROLS FROM *Ganoderma curtisii* AND *Ganoderma applanatum* FROM HIDALGO STATE, MEXICO

Miguel Á. Islas-Santillán¹, Leticia Romero-Bautista¹, Ricardo Valenzuela²,
J. Martín Torres-Valencia^{3,*}

(1) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de investigaciones biológicas, Laboratorio de etnobotánica, Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, 42184 Mineral de la Reforma, Hidalgo - México

(2) Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Plan de Ayala y Carpio s/n, Col. Santo Tomás, 11340 Ciudad de México - México

(3) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Química, Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, 42184 Mineral de la Reforma, Hidalgo - México

*autor de contacto (e-mail: jmartin@uaeh.edu.mx)

Recibido: 02/06/2017 - Evaluado: 23/07/2017 - Aceptado: 10/10/2017

RESUMEN

Ganoderma es un grupo de especies de interés comercial y con propiedades terapéuticas. En México existen al menos 20 especies, entre ellas *G. curtisii* y *G. applanatum*, las cuales crecen en el estado de Hidalgo. *G. curtisii* no ha sido explorada en su composición química, mientras que *G. applanatum*, colectada en otros países, cuenta con varios estudios químicos. El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar los principales metabolitos en estas especies para contribuir al conocimiento de la química del género. La separación mediante técnicas cromatográficas de los extractos hexánicos condujo al aislamiento de los esteroides conocidos, ergosterol, estelasterol, peróxido de ergosterol y 5 α -ergosta-7,22-dien-3-ona. Su proporción relativa en los extractos se analizó por HPLC y su caracterización se llevó a cabo mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, principalmente por RMN en 1D y 2D, y comparación con datos descritos. Estos esteroides se han reportado en *Ganoderma* y poseen actividad antioxidante, anticancerígena, antitumoral y antiinflamatoria.

ABSTRACT

Ganoderma is a group of species of commercial interest and with therapeutic properties. In Mexico there are at least 20 species, including *G. curtisii* and *G. applanatum*, which grow in the state of Hidalgo. There are not report on the chemical composition of *G. curtisii*, while *G. applanatum*, collected in other countries, has several chemical studies. The aim of this work was to isolate and characterize the main metabolites in these species to contribute to the chemical knowledge of the *genus*. The separation by chromatographic techniques of the hexane extracts led to the isolation of the known sterols ergosterol, estelasterol, ergosterol peroxide, and 5 α -ergosta-7,22-dien-3-one. Their relative proportion in extracts was analysed by HPLC and their characterization was carried out by their physical and spectroscopic properties, mainly by 1D and 2D NMR, and these were compared with described data. These sterols have been reported in *Ganoderma*, and possess antioxidant, anticancer, antitumor and anti-inflammatory activity.

Palabras clave: *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum*; estudio químico, esteroides principales

Keywords: *Ganoderma curtisii*, *G. applanatum*; chemical study, main sterols

INTRODUCCIÓN

El género *Ganoderma* es considerado un grupo complejo de especies fúngicas debido a la variabilidad morfológica que presentan (Ryvarden, 2000). Se ha documentado que cuenta con propiedades terapéuticas debido a la presencia de metabolitos bioactivos. Los estudios químicos en las últimas cuatro décadas han conducido al aislamiento de alrededor de 400 compuestos que corresponden principalmente a dos grupos: derivados de lanosterol y polisacáridos (Cole & Schweikert, 2003; Paterson, 2006; Trigos & Suárez-Medellín, 2011; Baby *et al.*, 2015). Sin embargo, gran número de especímenes de *Ganoderma* han sido nombradas erróneamente debido a la presencia de formas heterogéneas, dificultades taxonómicas e inconsistencias en la forma que el género se ha subdividido (Mueller *et al.*, 2007). Lo anterior ha resultado en un uso indistinto de nombres científicos para diferentes especies que dificulta corroborar las propiedades medicinales (Paterson, 2006). Por esta razón la taxonomía tradicional basada en la macromorfología y micromorfología de basidiomas, hifas y esporas, en la especificidad de hospederos y en la distribución geográfica, debe ser reforzada con el uso de técnicas de secuenciación molecular, además de la determinación química de compuestos que puede contribuir a una identificación adecuada de las especies al considerar las diferencias en su composición química (Hennicke *et al.*, 2016; Trigos & Suárez-Medellín, 2011). En México se han reportado al menos 20 especies de *Ganoderma*, de las cuales 7 se encuentran en el estado de Hidalgo: *G. applanatum*, *G. australe*, *G. brownii*, *G. curtisii*, *G. lobatum*, *G. oregonense* y *G. sessile*. Las especies de Hidalgo no han sido exploradas en su composición química. En este trabajo, se describe el estudio químico de los extractos hexánicos de basidiomas silvestres de *G. curtisii* y *G. applanatum*, el cual llevó al aislamiento de los esteroides ergosterol (**1**), estelasterol (**2**), peróxido de ergosterol (**3**) y a la cetona 5α -ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**) (Figura 1). Su caracterización se realizó mediante métodos espectroscópicos y comparación con datos descritos.

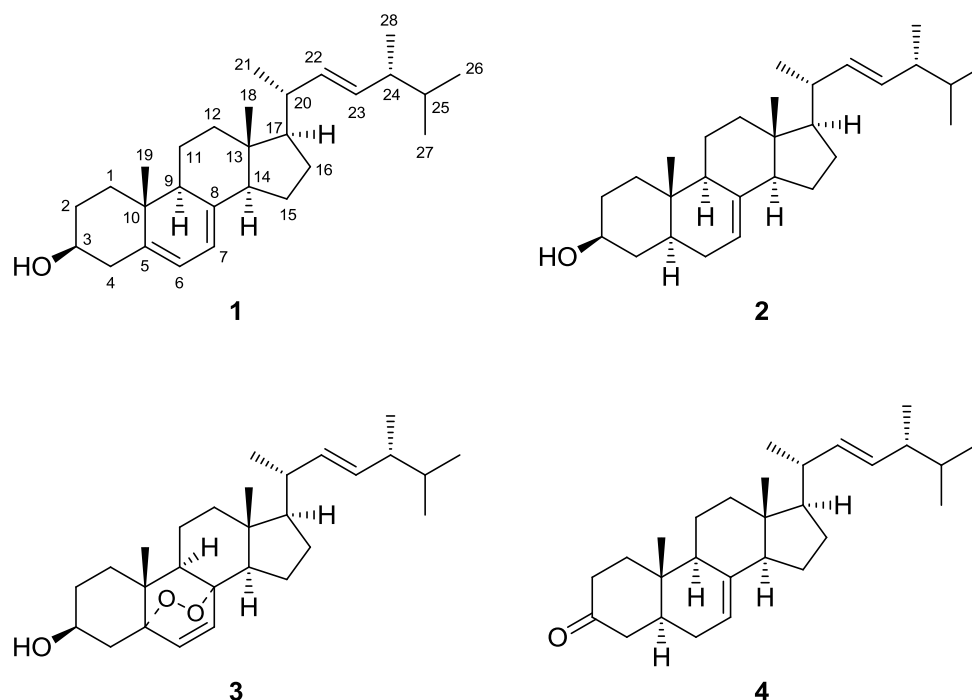


Fig. 1: Estructura química del ergosterol (**1**), estelasterol (**2**), peróxido de ergosterol (**3**), 5α -ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**), identificados en *Ganoderma curtisii* y *G. applanatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

General

Las separaciones mediante cromatografía en columna (CC) se llevaron a cabo en gel de sílice Merck 60 (Aldrich, 200–425 mesh ASTM), usando la técnica de cromatografía rápida (flash), en columnas de vidrio de 50 y 20 mm Ø, por 60 cm de largo. Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron sobre gel de sílice 60 F254 Merck soportada en placas de aluminio, empleando como revelador sulfato cérico(IV) amoniacal. El análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se efectuó en un equipo Perkin Elmer series 200 usando una columna preparativa SunFire Silica OBD, 100 Å, 5 µm, 19 × 250 mm, eluyendo con hexano (A) y acetato de etilo (AcOEt) (B), gradiente 100% A → 100% B en un tiempo de 25 minutos, a una velocidad de elución de 5.0 mL/min, empleando un detector de UV-visible a 300 nm a 25 °C. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono trece (RMN de ¹H y ¹³C), incluyendo los experimentos gCOSy, gHSQC y gHMBC, se determinaron en un espectrómetro Bruker Ascend 400 o Varian VNMRS 400 en soluciones de CDCl₃, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Material biológico

Los basidiomas de *Ganoderma curtisii* y *G. applanatum* se recolectaron en bosque templado de *Pinus-Quercus* del municipio de Acaxochitlán, estado de Hidalgo, México. Un ejemplar 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, registrados los especímenes como IslasA10, IslasA14. La determinación de los especímenes se hizo con base en los trabajos de Gilbertson y Ryvarden (1986) y López-Peña *et al.* (2016).

Extracción y separación de compuestos

Los basidiomas deshidratados y molidos de *G. curtisii* (500 g) se extrajeron de manera secuencial con hexano (2 L), acetato de etilo (2 L) y metanol (2 L), por maceración durante 15 días, filtrado y concentrado en el rotavapor, para obtener los extractos correspondientes (0.647 g, 1.5 g y 2.1 g). El extracto hexánico formó un precipitado cristalino que separó por decantación (6.5 mg) y su análisis por RMN de ¹H, mostró estar constituido por ergosterol (**1**) y estelasterol (**2**) en una proporción relativa de aproximadamente 85:15. La solución decantada del extracto hexánico se sometió a separación mediante CC (columna de 50 mm Ø), usando hexano-acetato de etilo (4:1) y colectando fracciones de 50 mL. En la fracción 12 se obtuvo el peróxido de ergosterol (**3**) como un sólido amorfo de color ligeramente naranja (47.4 mg). La fracción 9 (313 mg) se purificó por CC (columna de 20 mm Ø), en hexano-acetato de etilo (4:1 y 1:1), colectando 34 fracciones de 20 mL. En las fracciones 32 y 33, eluidas con hexano-acetato de etilo (1:1), se obtuvo la mezcla de los esteroides **1** y **2**, mientras que en la fracción 34 (20 mg) se obtuvo el ergosterol (**1**). La fracción 33 (190 mg) se recromatografió con hexano-acetato de etilo (7:3), CHCl₃ y acetona, colectando 26 elatos de 20 mL. En la fracción 7 (81.4 mg) se obtuvo el esteroide **1** junto con **2**. Esta fracción se cristalizó de CHCl₃-Metanol para obtener **2** con restos del ergosterol, como un sólido de color amarillo claro (16.4 mg).

Los basidiomas deshidratados y molidos de *G. applanatum* (500 g) se extrajeron con hexano (2 L), seguido por acetato de etilo (2 L) mediante maceración por 15 días, filtrado y concentrado en el rotavapor, para obtener los extractos respectivos (0.967 g y 1.16 g), cuyo análisis por RMN de ¹H, mostró una composición similar entre ellos y a los de *G. curtisii*. En este caso, del extracto hexánico también se obtuvo un precipitado (130 mg), cuyo análisis por RMN de ¹H mostró nuevamente los compuestos **1** y **2** en una proporción relativa de 70:30. La purificación de este residuo por CC, empleando hexano-acetato de etilo (4:1) y colectando 24 fracciones de 20 mL, permitió obtener **1** (80 mg) en las fracciones 12–16. El extracto hexánico (el resto de lo que no precipitó) se sometió a separación por CC empleando una columna de 50 mm Ø, hexano-acetato de etilo (4:1) y colectando 15 fracciones de 50 mL. Las fracciones 4 y 5 (137 mg) se purificaron por CC (columna 20 mm Ø), con hexano-acetato de etilo

(4:1) y colectando 20 fracciones de 20 mL. De la fracción 5 se obtuvo la 5 α -ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**) (50 mg). Las fracciones 8 y 9 de la primera columna se unieron (380 mg) y se fraccionaron con hexano-acetato de etilo (4:1), colectando 20 fracciones de 20 mL. El análisis por RMN de ^1H de las fracciones 12–13 (222 mg) evidenciaron la presencia del esteroide **2**, con restos **3** y **1**, mientras que en la fracción 19 se obtuvo **3** (12.9 mg).

Ergosterol (**1**): Sólido cristalino, punto de fusión = 155–157 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 5.57 (1H, dd, J = 5.6, 2.4 Hz, H-6), 5.38 (1H, dt, J = 5.6, 2.7 Hz, H-7), 5.23 (1H, dd, J = 15.3, 7.1 Hz, H-23), 5.17 (1H, dd, J = 15.3, 7.6 Hz, H-22), 3.64 (1H, tt, J = 11.4, 4.3 Hz, H-3), 2.47 (1H, ddd, J = 14.3, 4.9, 2.4 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, dd, J = 14.4, 13.7 Hz, H-4 β), 1.03 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-21), 0.95 (3H, s, Me-19), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, Me-28), 0.83 (3H, d, J = 6.4 Hz, Me-26), 0.81 (3H, d, J = 6.4 Hz, Me-27), 0.63 (3H, s, Me-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 141.3 (C-8), 139.7 (C-5), 135.5 (C-22), 131.9 (C-23), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 70.4 (C-3), 55.7 (C-17), 54.5 (C-14), 46.2 (C-9), 42.8 (C-13, C-24), 40.8 (C-4), 40.4 (C-20), 39.1 (C-12), 38.4 (C-1), 37.0 (C-10), 33.1 (C-25), 32.0 (C-2), 28.3 (C-16), 23.0 (C-11), 21.1 (C-15, C-21), 19.9 (C-27), 19.6 (C-26), 17.6 (C-28), 16.3 (C-19), 12.0 (C-18).

Estelasterol (**2**): Sólido cristalino, punto de fusión = 173–176°C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 5.21 (1H, dd, J = 15.4, 7.1 Hz, H-23), 5.16 (1H, dd, J = 15.4, 7.7 Hz, H-22), 5.15 (1H, m, H-7), 3.60 (1H, tt, J = 11.0, 4.5 Hz, H-3), 1.00 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-21), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, Me-28), 0.83 (3H, d, J = 6.2 Hz, Me-26), 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-27), 0.79 (3H, s, Me-19), 0.54 (3H, s, Me-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 139.5 (C-8), 135.6 (C-22), 131.8 (C-23), 117.4 (C-7), 71.0 (C-3), 55.2 (C-17), 51.1 (C-14), 49.4 (C-9), 43.3 (C-13), 42.8 (C-24), 40.5 (C-20), 40.2 (C-5), 39.4 (C-12), 37.1 (C-1), 34.2 (C-10), 33.1 (C-25), 31.4 (C-6), 29.6 (C-16), 28.1 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 21.1 (C-21), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28), 13.0 (C-19), 12.1 (C-18).

Peróxido de ergosterol (**3**): Polvo amorfo ligeramente amarillo, punto de fusión = 150–153 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 6.50 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-7), 6.24 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6), 5.22 (1H, dd, J = 15.2, 7.4 Hz, H-23), 5.14 (1H, dd, J = 15.2, 8.4 Hz, H-22), 3.97 (1H, tt, J = 11.4, 5.1 Hz, H-3), 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-21), 0.90 (3H, d, J = 6.8 Hz, Me-28), 0.88 (3H, s, Me-19), 0.83 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me-27), 0.82 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-26). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 135.4 (C-6), 135.2 (C-22), 132.3 (C-23), 130.7 (C-7), 82.1 (C-5), 79.4 (C-8), 66.4 (C-3), 56.2 (C-17), 51.7 (C-14), 51.0 (C-9), 44.5 (C-13), 42.7 (C-24), 39.7 (C-20), 39.3 (C-12), 36.9 (C-4, C-10), 34.7 (C-1), 33.0 (C-25), 30.1 (C-2), 28.6 (C-16), 23.4 (C-15), 20.9 (C-21), 20.6 (C-11), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 18.2 (C-19), 17.5 (C-28), 12.9 (C-18).

5 α -Ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**): Sólido cristalino ligeramente amarillo, punto de fusión = 170–173 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 5.22 (1H, dd, J = 7.1, 15.3 Hz, H-23), 5.18 (1H, m, H-7), 5.16 (1H, dd, J = 7.6, 15.3 Hz, H-22), 2.43 (1H, td, J = 14.5, 6.0 Hz, H-2 β), 1.03 (3H, d, J = 6.5 Hz, Me-21), 1.02 (3H, s, Me-19), 0.92 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me-28), 0.84 (3H, d, J = 6.3 Hz, Me-26), 0.82 (3H, d, J = 6.3 Hz, Me-27), 0.58 (3H, s, Me-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 212.0 (C-3), 139.5 (C-8), 135.6 (C-22), 131.9 (C-23), 117.0 (C-7), 55.9 (C-17), 55.0 (C-14), 48.8 (C-9), 44.2 (C-4), 43.3 (C-13), 42.9 (C-24), 42.8 (C-2), 40.5 (C-20), 39.3 (C-12), 38.8 (C-5), 38.1 (C-1), 34.4 (C-10), 33.1 (C-25), 30.0 (C-6), 28.1 (C-16), 22.9 (C-15), 21.7 (C-11), 21.1 (C-21), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28), 12.5 (C-19), 12.1 (C-18).

Ácido oleico y ácido linoleico: Líquido viscoso ligeramente amarillo. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 5.34 (m, H-9, H-10, H-12, H-13), 2.77 (t, J = 6.2 Hz, H-11, ácido linoleico), 2.35 (t, J = 7.5 Hz, H-2), 2.02 (m, H-8, H-11, H-14), 1.63 (quint. J = 7.2 Hz, H-3), 1.31 y 1.25 (s a, H-4–H-7, H-12–H-17 y/o H-15–H-17), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, H-18). Ácido oleico, RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 178.7 (C-1), 130.0, 129.7 (C-9, C-10), 33.8 (C-2), 31.9, 29.7, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 27.2, 24.7, 22.7, (C-3–C-8, C-11–C-17), 14.1 (C-18).

Identificación de esteroides en extractos por HPLC

Los extractos hexánicos (10 mg) de ambas especies se disolvieron en hexano-acetato de etilo (1:1, 1 mL) y se analizaron por HPLC, empleando como referencia los compuestos **1**, **2** y **4** aislados en este trabajo (10 mg de

cada compuesto disueltos en 1 mL de hexano-acetato de etilo 1:1). Se inyectaron 100 μ L de cada extracto y 50 μ L de cada referencia. Se eluyó con hexano (A) y Acetato de etilo (B) (65:35) por 12 min, luego se hizo un gradiente 65% A y 35% B \rightarrow 0% A y 100% B durante 25 min, usando una velocidad de elución de 5 mL/min, y un detector de UV-visible a 300 nm a 25 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por cromatografía en capa fina y resonancia magnética nuclear de protón de los extractos obtenidos de los basidiomycetes de *G. curtisii* y *G. applanatum* evidenció que los extractos de hexano y acetato de etilo tenían la misma composición, esteroides y ácidos grasos, pero más abundantes en el de hexano. Por su parte, en el extracto metanólico de *G. curtisii* se observó una mezcla compleja de polisacáridos y no se continuó con su estudio. El extracto hexánico de *G. curtisii* formó un precipitado cristalino que separó por decantación y su análisis por RMN de ^1H , mostró estar constituido básicamente por 2 esteroides, que posteriormente se caracterizaron como ergosterol (**1**) y estelasterol (**2**) en una proporción relativa de aproximadamente 85:15, respectivamente. Asimismo, el extracto hexánico de *G. applanatum* también formó un precipitado cuyo análisis por RMN de ^1H constituido por los esteroides **1** y **2**, pero en una proporción relativa de 70:30, en ese orden. La separación mediante cromatografía en columna de la solución decantada del extracto hexánico de *G. curtisii*, condujo a la obtención de tres esteroides conocidos en *Ganoderma*: ergosterol (**1**) (Seo *et al.*, 2009), estelasterol (**2**) (Seo *et al.*, 2009; Leliebre-Lara *et al.*, 2016) y peróxido de ergosterol (**3**) (Seo *et al.*, 2009; Leliebre-Lara *et al.*, 2016), los cuales se caracterizaron con base en sus datos físicos y espectroscópicos, principalmente RMN de ^1H (Figura 2) y ^{13}C (Figura 3) en 1D y 2D, y se compararon con los descritos (Seo *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2014). El análisis con detalle de sus espectros, haciendo ampliaciones adecuadas, nos permitió asignar la mayoría de sus señales, así como determinar los desplazamientos químicos y la multiplicidad de las mismas. De la misma forma, la cromatografía en columna de la solución decantada del extracto hexánico de *G. applanatum*, permitió obtener, en adición de los esteroides **1-3**, la 5 α -ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**), que también es conocida en el género (Yang *et al.*, 2014). En las fracciones iniciales se obtuvo una mezcla de dos ácidos grasos, cuya comparación de sus datos de RMN de ^1H con los descritos (catálogo de Aldrich) evidenció que se trata de los ácidos oleico y linoleico, en una proporción relativa de alrededor de 3:1, respectivamente. La comparación de los espectros de RMN de ^1H los extractos hexánicos de ambas especies evidenció que estos ácidos grasos también están presentes en el extracto de *G. curtisii* pero en menor abundancia. Lo anterior se corroboró mediante el análisis por HPLC de los extractos.

Los extractos hexánicos de *G. curtisii* y *G. applanatum* se analizaron por HPLC con la finalidad de identificar los esteroides caracterizados, usando como referencia los compuestos **1**, **2** y **4**, obtenidos en este trabajo. El esteroide **3** no se pudo emplear como referencia debido a su descomposición en compuestos que no pudieron identificarse, aunque fue lo suficientemente estable como para permitir la determinación de sus datos físicos y espectroscópicos. Los antecedentes sobre el aislamiento y caracterización de estos esteroides han evidenciado el empleo de gel de sílice y mezclas de hexano-acetato de etilo como fase móvil, y en el espectro de UV han mostrado máximos de adsorción entre 240–290 nm (Seo *et al.*, 2009). En este trabajo se empleó un detector de UV-visible a $\lambda=300$ nm con la finalidad de no saturar la señal en el cromatograma debido a la cantidad de muestra aportada por la columna preparativa. Así una alícuota de cada extracto, se disolvió en hexano-acetato de etilo (1:1) y se inyectaron a una columna preparativa empacada con gel de sílice y usando un gradiente de los mismos disolventes (ver experimental). Los perfiles cromatográficos de cada extracto se muestran en la Figura 4. En el caso de *G. curtisii* (Fig. 4a) se pudo identificar a los esteroides **1** y **2**, así como al ácido oleico, cuya integral del área bajo la curva fue 52.9%, 15.8% y 11.7%, respectivamente. Por su parte, en *G. applanatum* (Fig. 4b) se identificaron los esteroides **1**, **2** y **4**, los ácidos grasos oleico y linoleico y otras sustancias grasas, en una proporción de 30.2%, 3.9%, 14.4%, 18.3%, 6.4%, y 24.0%, correspondientemente.

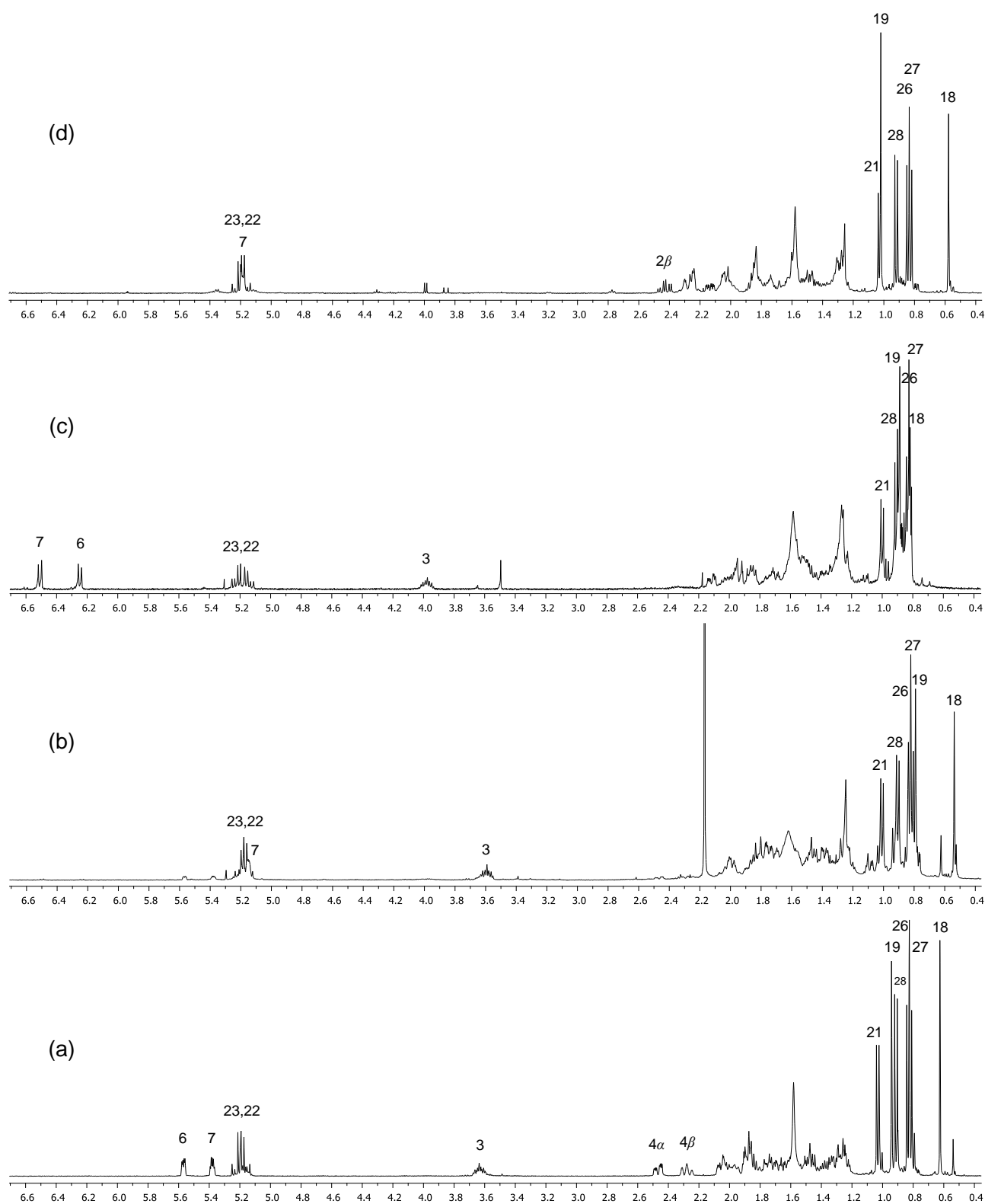


Fig. 2: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 , de (a) ergosterol (**1**), (b) estelasterol (**2**), (c) peróxido de ergosterol (**3**) y (d) 5α -ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**).

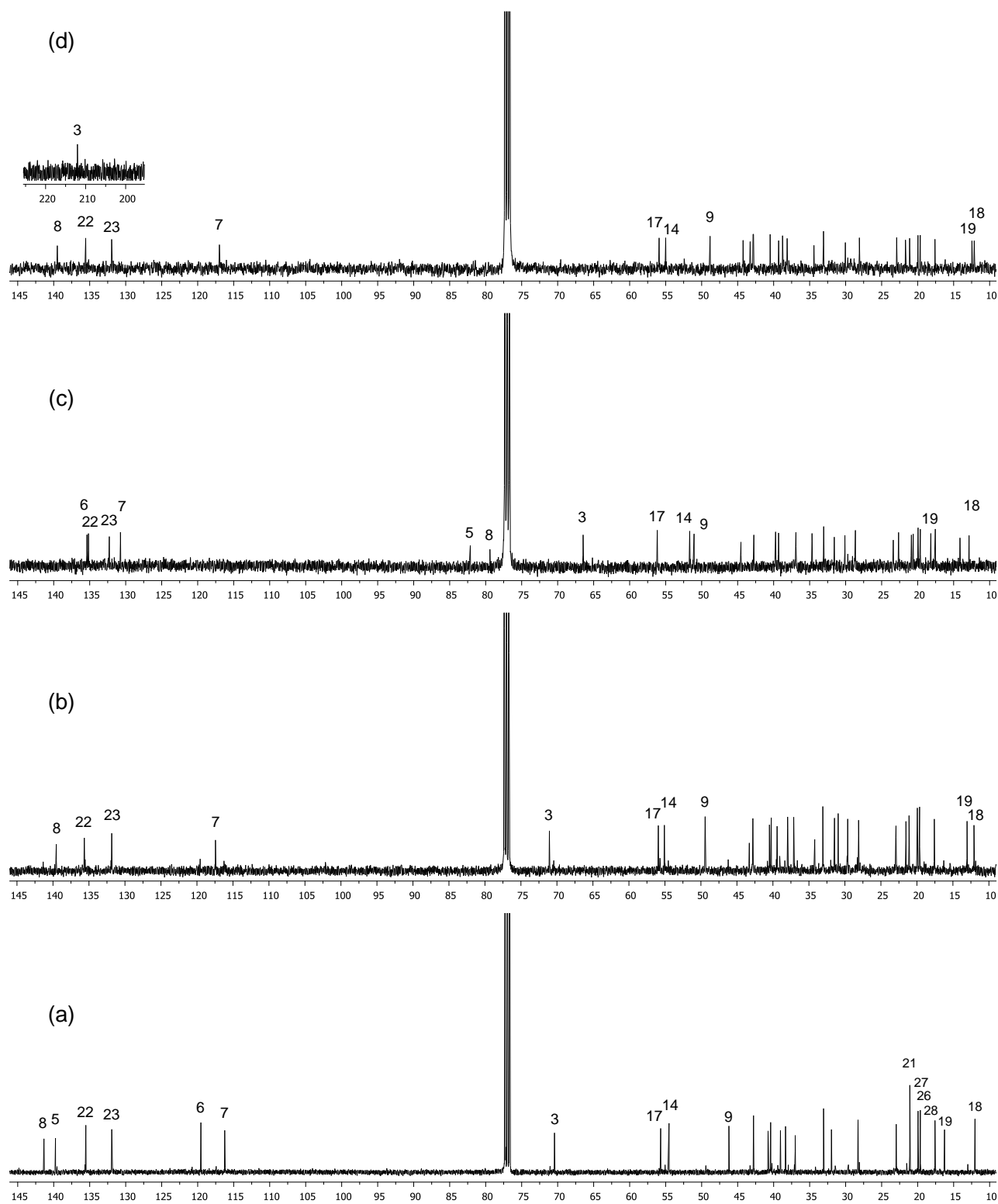


Fig. 3: Espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 , de (a) ergosterol (**1**), (b) ergosta-7,22-dien-3 β -ol (**2**), (c) peróxido de ergosterol (**3**) y (d) 5 α -ergosta-7,22-dien-3-ona (**4**).

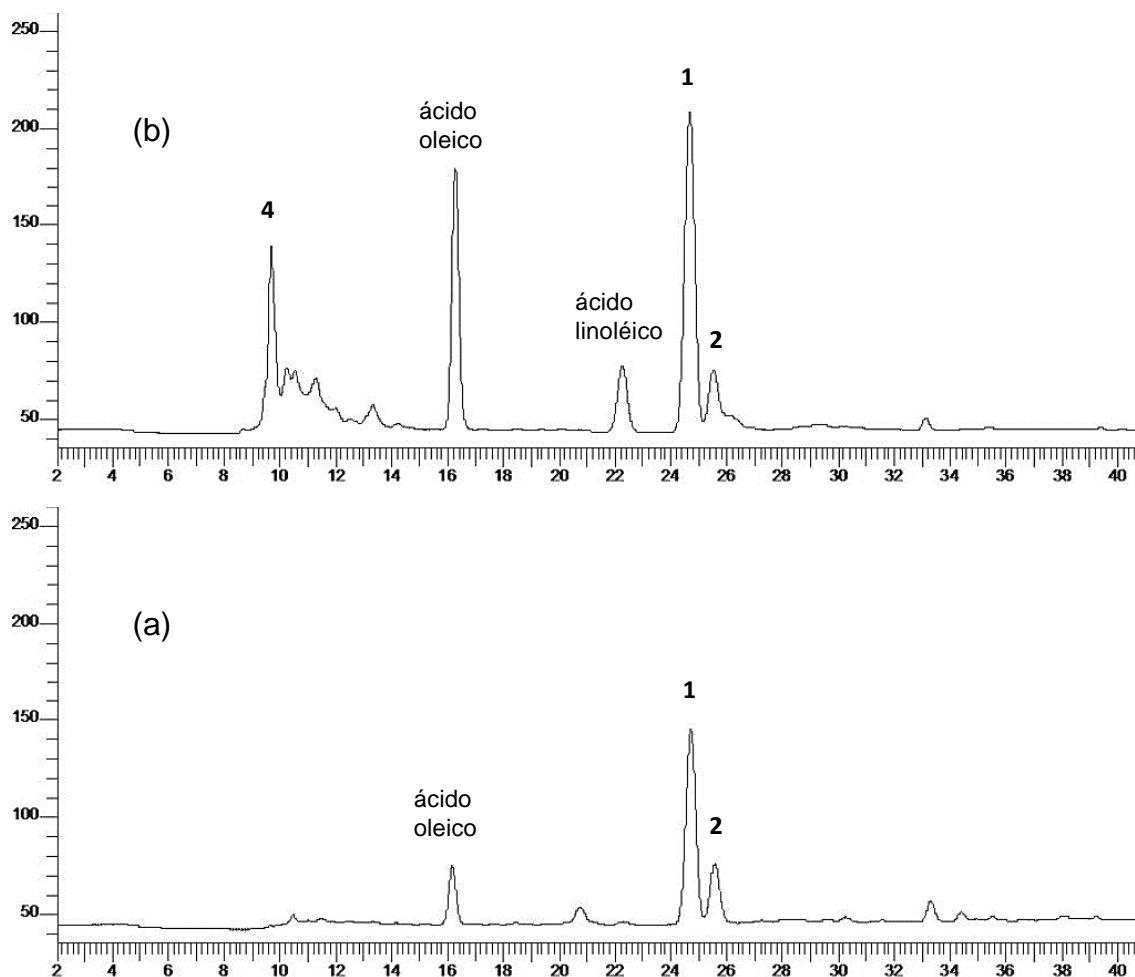


Fig. 4: Perfil cromatográfico (HPLC) de los extractos hexánicos de *G. curtisii* (a) y *G. applanatum* (b).

Tabla 1: Especies del género *Ganoderma* en las que se han reportado los compuestos 1–4.

Compuesto	Especies	Referencia
1	<i>G. australe</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. curtisii</i> , <i>G. lipsiense</i> , <i>G. oerstedii</i> , <i>G. zonatum</i> , <i>G. lucidum</i>	Ming <i>et al.</i> , 2002; Paterson, 2006; Seo <i>et al.</i> , 2009; Guzmán <i>et al.</i> , 2013; Mendoza, <i>et al.</i> , 2015.
2	<i>G. australe</i> , <i>G. amboinense</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. carnosum</i> , <i>G. concinnum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. mastoporum</i> , <i>G. neojaponicum</i> , <i>G. pfeifferi</i> , <i>G. tsugae</i> , <i>G. zonatum</i> .	Gan <i>et al.</i> , 1998; González <i>et al.</i> , 2002; Paterson, 2006; Seo <i>et al.</i> , 2009; Tonjock & Afui, 2011; Guzmán <i>et al.</i> , 2013; Thang <i>et al.</i> , 2013; Suárez-Medellin <i>et al.</i> , 2014.
3	<i>G. australe</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. concinnum</i> , <i>G. mastoporum</i> , <i>G. oerstedii</i> , <i>G. lucidum</i>	González <i>et al.</i> , 2002; Seo <i>et al.</i> , 2009; Mendoza <i>et al.</i> , 2015
4	<i>G. australe</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. concinnum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. mastoporum</i> , <i>G. neojaponicum</i> , <i>G. oerstedii</i> , <i>G. pfeifferi</i> , <i>G. Tsugae</i>	González <i>et al.</i> , 2002; Niedermeyer <i>et al.</i> , 2005; Paterson, 2006; Ko <i>et al.</i> , 2008; Thang <i>et al.</i> , 2013; Suárez-Medellin <i>et al.</i> , 2014; Mendoza <i>et al.</i> , 2015.

Los esteroides identificados coinciden con estudios que reportan su presencia en *Ganoderma* (Lindequist, 1995; Paterson, 2006; Wiseman, 1993; Yazawa *et al.*, 2000; Trigos & Suárez-Medellín, 2011; Mendoza *et al.*, 2015). El ergosterol (**1**) y el peróxido de ergosterol (**3**) se han reportados en varias especies fúngicas, incluyendo *G. curtisii* y *G. applanatum* (Trigos & Suárez-Medellín, 2011), mientras que el estelasterol (**2**) y la cetona **4** se han identificado en *G. applanatum* pero no en *G. curtisii* (Tabla 1). Los esteroides **1–4** presentan varias e importantes actividades biológicas que contribuyen a su efecto medicinal, entre ellas antiinflamatoria, cardiovascular, antioxidante, antitumoral, anticancerígena (Mizuno *et al.*, 1995; Lindequist, 1995), como se especifica en la Tabla 2.

Tabla 2: Actividad biológica de los esteroides aislados de *G. curtisii* y *G. applanatum*.

Compuesto	Actividad biológica	Referencia
1	Reducción de dolor por inflamación, reducción de accidentes cardiovasculares, antioxidante, antiinflamatorio, antihiperlipidémico, precursor de la vitamina D, inhibe crecimiento tumoral al inducir la apoptosis, inhibe la angiogénesis y el crecimiento celular de Sarcoma 180 <i>in vitro</i> .	Wiseman, 1993; Bok <i>et al.</i> , 1999; Yazawa <i>et al.</i> , 2000; Takaku <i>et al.</i> , 2001; Subbiah & Abplanalp, 2003; Hu <i>et al.</i> , 2006.
2	Antiinflamatorio, antiviral contra herpes simple, produce apoptosis en cáncer de mama (MCF-7) y neuroblastoma (SH-SY5Y), inhibe el crecimiento celular de cáncer de hígado y carcinoma (KB)	Lin <i>et al.</i> , 1991; Niedermeyer <i>et al.</i> , 2005; Trigos, A. & Suárez-Medellín, 2011; Pereira <i>et al.</i> , 2013.
3	Antitumoral, anticancerígeno, antimelanogénico, antiateroesclerosis, inhibe el crecimiento celular de cáncer colorectal HT29 <i>in vitro</i> .	Kim <i>et al.</i> , 1999; Rösecke <i>et al.</i> , 2000; Takaku <i>et al.</i> , 2001; Kobori <i>et al.</i> , 2007; Russo <i>et al.</i> , 2010; Trigos & Suárez-Medellín, 2011; Ramos-Ligonio <i>et al.</i> , 2012.
4	Antioxidante, inhibe crecimiento celular en cáncer de mama (T47D) <i>in vitro</i> .	Ko <i>et al.</i> , 2008; Fangkrathok <i>et al.</i> , 2013; Thang <i>et al.</i> , 2013

CONCLUSIONES

El estudio químico de *Ganoderma curtisii* condujo a la caracterización de sus principales metabolitos, los esteroides **1–3**, mientras que en *G. applanatum*, a parte de los compuestos **1–3**, también se identificó la cetona **4**. Estos compuestos se han obtenido de diferentes especies de *Ganoderma* y poseen importante actividad antioxidante, anticancerígena, antitumoral y antiinflamatoria, entre otras. Esta investigación es la primera que se realiza sobre especies de *Ganoderma* que crecen en el estado de Hidalgo, México, y contribuye al conocimiento de la composición química del género.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT-México, por el financiamiento parcial (proyectos S005-2012-2-0198333 y 238206). Miguel Ángel Islas Santillán agradece al CONACYT por la beca No. 389008. Valenzuela agradece a la COFAA y al IPN (proyectos SIP 20170845, 20170846) por el apoyo a sus investigaciones.

REFERENCIAS

1. Baby, S., Johnson, A.J. & Govindan, B. (2015). Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, 114, 66-101.
2. Bok, J.W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H.G. & Towers, G.H. (1999). Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51 (7), 891-898.

3. Cole, R.J. & Schweikert, M.A. (2003). *Handbook of secondary fungal metabolites*. Academic Press, San Diego.
4. Fangkrathok, N., Junlatat, J. & Sripanidkulchai, B. (2013). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous*. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(3), 631-637.
5. Gan, K.H., Kuo, S.H. & Lin, C.N. (1998). Steroidal constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *Journal of Natural Products*, 61, 1421-1422.
6. Gilbertson, R.L. & Ryvarden, L. (1986). *North American Polypores. Abortiporus-Lindteria*. Fungiflora, Oslo. 443 p.
7. González, A.G., León, F., Rivera, A., Padrón, J., González-Plata, J., Zuluaga, J. *et al.* (2002). New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *Journal of Natural Products*, 65, 417-421.
8. Guzmán, M.S., Santafé, G.G., Salcedo, M.M., Angulo, A.A. & Torres, O. (2013). Estudio químico y actividades antioxidante y bactericida de *Ganoderma applanatum*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11 (1), 88-94.
9. Hennicke, F., Cheikh-Ali, Z., Liebisch, T., Maciá-Vicente, J.G., Bode, H.B & Piepenbring, M. (2016). Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. *Phytochemistry*, 127, 29-37.
10. Hu, S.H., Liang, Z.C., Chia, Y.C., Lien, J.L., Chen, K.S., Lee, M.Y. *et al.* (2006). Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (6), 2103-2110.
11. Kim, S.W., Park, S.S., Min, T.J. & Yu, K.H. (1999). Antioxidant activity of ergosterol peroxidase (5-8-Epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 α -ol) in *Armillariella mellea*. *Bulletin of Korean Chemical Society*, 20, 819-823.
12. Ko, H.H., Hung, C.F., Wang, J.P. & Lin, C.N. (2008). Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69(1), 234-239.
13. Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama M. & Shinmoto, H. (2007). Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 150 (2), 209-219.
14. Leliebre-Lara, V., Monzote, L., Pferschy-Wenzing, E., Kunert, O., Nogueiras Lima, C. & Bauer, R. (2016). In vitro antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). *Molecules*, 21, 1045.
15. Lin, C.N., Tome, W.P. & Won, S.J. (1991). Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products*, 54, 998-1002.
16. Lindequist, U. (1995). Structure and biological activity of triperpens, polysaccharides and other constituents of *Ganoderma lucidum*. En B.K. Kim, I.H. Kim & Y.S. Kim (eds.). Recent advances in *Ganoderma lucidum* Research (pp. 61-91): The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul.
17. López-Peña, D., Gutiérrez, A., Hernández-Navarro, E., Valenzuela R. & Esqueda M. (2016). Diversidad y distribución de *Ganoderma* (Polyporales: Ganodermataceae) en Sonora, México. *Botanical Sciences*, 94 (2), 431-439.

18. Mendoza, G., Suárez-Medellín, J., Espinoza, C., Ramos-Ligonio, A., Fernández, J.J., Norte, M. *et al.* (2015). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(6), 501-509.
19. Ming, D.S., Chilton, J., Fogarty, F. & Towers, G.H.N. (2002). Chemical constituents of *Ganoderma applanatum* of British Columbia forests. *Fitoterapia*, 73, 147-152.
20. Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T. & Kawagishi, H. (1995). Antitumor active substances from mushrooms. *Food Reviews International*. 11 (1), 23-61.
21. Mueller, G.M., Shcmit, J.P., Leacock, P.R., Buyck, B. & Cifuentes, J. (2007). Global diversity and distribution of macro fungi. *Biodiversity and Conservation*, 16, 37-48.
22. Niedermeyer, T.H., Lindequist, U., Mentel, R., Gördes, D., Schmidt, E., Thurow, K., *et al.* (2005). Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of Natural Products*, 68 (12), 1728-1731.
23. Paterson, R.R.M. (2006). *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67, 1985-2001.
24. Pereira, D.M., Correia-da-Silva, G., Valentão, P., Teixeira, N. & Andrade, P.B. (2013). Palmitic acid and ergosta-7,22-dien-3-ol contribute to the apoptotic effect and cell cycle arrest of an extract from *Marthasterias glacialis* L. in neuroblastoma cells. *Mar Drugs*, 12 (1), 54-68.
25. Ramos-Ligonio, A., López-Monteon, A. & Trigos, A. (2012). Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy Research*, 26 (6), 938-943.
26. Rösecke, J., Pietsch, M. & König W.A. (2000). Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*, 54, 747-750.
27. Russo, A., Cardile, V., Piovano, M., Caggia, S., Espinoza, C.L. & Garbarino, J.A. (2010). Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22*E*)-ergosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 184 (3), 352-358.
28. Ryvarden, L. (2000). Studies in neotropical Polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia*, 92 (1), 181-191.
29. Seo, H.W., Hung, T.M., Na, M., Jung, H.J., Kim, J.C., Choi, J.S. *et al.* (2009). Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. *Archives of Pharmacal Research*, 32 (11), 1573-1579.
30. Suárez-Medellín, J., Mendoza, G., Espinoza, C., Suárez-Quiroz, M. & Trigos, A. (2014). Lanostanoids isolated from the basidiocarps of a mexican strain of medicinal fungus *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. *Latin American Journal of Pharmacy*, 33 (2), 224-230.
31. Subbiah, M.T.R. & Abplanalp, W. (2003). Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73 (1), 19-23.
32. Takaku, T., Kimura, Y. & Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 131 (18), 1409-1413.
33. Thang, T.D., Kuo, P.C., Hwang, T.L., Yang, M.L., Ngoc, N.T., Han, T.T. *et al.* (2013). Triterpenoids and steroids from *Ganoderma mastoporium* and their inhibitory effects on superoxide anion generation and elastase release. *Molecules*, 18 (11), 14285-14292.

34. Tonjock, R.K. & Afui, M.M. (2011). Secondary metabolites of oil palm isolates of *Ganoderma zonatum* Murrill. from Cameroon and their cytotoxicity against five human tumor cell lines. *African Journal of Biotechnology*, 10 (42), 8440-8447.
35. Trigos, A. & Suárez-Medellín, J. (2011). Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 63-83.
36. Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Letters*, 326, 285-288.
37. Yang, P., Liu, C., Wang, H., Li, J., Wang, Z., Xiao, W., *et al.* (2014). Chemical constituents of *Poria cocos*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 39 (6), 1030-1033.
38. Yazawa, Y., Yokota, M. & Sugiyama, K. (2000). Antitumor promoting effect of an active component of *Polyporus*, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 1298-1302.