



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  

---

---

UNIDAD IZTAPALAPA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
LA FASE VEGETATIVA Y REPRODUCTIVA DE *Pleurotus*  
*ostreatus* DESARROLLADO EN PAJA DE TRIGO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA  
MCB IVETTE GONZÁLEZ PALMA**

**DIRECTOR  
DR. JORGE SORIANO SANTOS**

**CODIRECTOR  
DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ**

**CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2017**

El doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con la referencia 001466

Ivette González Palma recibió una beca para estudios de doctorado por el CONACYT con número 230520

Esta investigación se realizó en el laboratorio de la planta piloto No. 1 “Nutracéuticos y alimentos funcionales” del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa y en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Ciudad de México, 6 de marzo de 2016

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de la unidad Iztapalapa

Aprobó la tesis

**Evaluación de la actividad antioxidante de la fase vegetativa y reproductiva  
de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en paja de trigo**

que presenta

MCB Ivette González Palma

Comité tutorial

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Codirector: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Asesor: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Jurado

Presidente: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Secretario: Dr. Rubén Díaz Godínez

Vocal: Dr. Jorge Álvarez Cervantes

Vocal: Dra. Edna María Hernández Domínguez



## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, y al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta investigación.

Al Dr. Jorge Soriano Santos, por darme la oportunidad de formar parte en su laboratorio de la planta piloto No. 1 “Nutracéuticos y alimentos funcionales” del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa; asimismo, por sus valiosos aportes a este proyecto y por el apoyo en todo momento durante mi formación en el posgrado.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez por considerarme dentro de su equipo de trabajo en el Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Así como el apoyo y consejos recibidos durante mi estancia; por su valiosa amistad y, finalmente, por la gran contribución para la publicación del artículo.

Al Dr. Héctor B. Escalona Buendía, por todo el interés que mostró durante mi etapa de formación; por las valiosas aportaciones y buena disponibilidad para este proyecto de investigación.

## **Agradecimientos a título personal**

A un gran amigo, Maximiliano Curiel Vera†, porque me brindó una amistad invaluable, y siempre creyó en mí. ¡Infinitamente mil gracias por todo!

A ti mi gran amiguita incondicional† porque siempre estuviste conmigo dándome todo tu cariño. Gracias por haber estado en mi vida.

Agradezco a mis amigos Andrés†, Guille, Paty, Víctor, Karen, Sandra, Daysi y Belem por su amistad y porque durante esta etapa de formación estuvieron a mi lado echándome porras en cada momento.

A Francisco Varela por su gran amistad, consejos y por el apoyo que me ha brindado en todo momento. ¡Estoy segura que disfrutará leyendo esta tesis!

Son numerosas las personas especiales a las que les agradezco su amistad y ayuda, en donde cada momento me daban ánimos para seguir con todo este proyecto profesional. Algunas están aquí conmigo, otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar dónde estén, les agradezco a todos por haber llegado a mi vida y el compartir el instante, ese regalo del presente que nos hace crecer y valorar a las personas que nos rodean.

¡Sin excluir a ninguno, gracias!

## **Dedicatoria**

### **A Dios**

Por bendecirme primeramente con el don de la vida, después por darme fortaleza para llegar hasta donde estoy y principalmente por darme la oportunidad de seguir con esas personitas tan especiales en mi vida:

Antonio González Flores: por la confianza y creer nuevamente en mí. Por escucharme y apoyarme en cada momento que lo necesito, yo sé que puedo contar contigo siempre. Por llenarme todos los días de ese cariño que yo siempre necesito y me alienta para seguir adelante. ¡Te amo papi!

Adela G. Palma Sánchez: por la confianza y creer nuevamente en mí. Por el gran apoyo que siempre me das. Porque incluso cuando tuve que trabajar hasta tarde tú siempre estabas ahí, mi gran compañera nocturna. Por ese gran cariño que me das, que siempre llevo en el corazón con el que salgo adelante día a día. ¡Te amo mami!

Maribel González Palma: por el apoyo y consejos que siempre me das incluso, hasta cuando me regañas. Sabes que te quiero y admiro mucho. Otra vez... ¿Adivina qué? He terminado este nuevo reto y ahora te digo que aquí te espero. Es tu decisión si quieres alcanzarme. La nueva meta ya está, el reto es tuyo. Sabes que siempre te voy a apoyar. ¡Éxito!

Porque los tres son mi razón de felicidad y alegría de todos los días, ¡gracias!

## RESUMEN

En búsqueda de nuevos conocimientos acerca de metabolitos producidos por los hongos y su relación con la actividad antioxidante, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante de micelio, primordio y cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus* desarrollados en paja de trigo. Se evaluó el contenido de polifenoles totales y flavonoides, así como, el poder antioxidante reductor de hierro (FRAP), actividad quelante de iones metálicos, poder reductor y actividad reductora de DPPH y ABTS. Estas pruebas se llevaron a cabo con extractos a partir del hongo en sus distintas fases de crecimiento (deshidratadas y frescas), con solventes de diferente polaridad (agua y metanol) y diferente temperatura (temperatura ambiente y ebullición). Los resultados para polifenoles totales obtenidos en esta investigación mostraron que el mejor extracto fue el metanólico de primordio fresco obtenido por ebullición, seguido del extracto acuoso del cuerpo fructífero, obtenido a temperatura ambiente, con  $12.06 \pm 0.02$  y  $11.36 \pm 0.04$  mg EAG/g, respectivamente. Para el caso de los flavonoides, en general, representaron un porcentaje muy bajo del contenido total de polifenoles, los valores oscilaron entre  $0.011 \pm 0.001$  y  $1.04 \pm 0.01$  mg EQ/g. En lo que respecta a los diferentes métodos de actividad antioxidante: en el método de FRAP, los mejores extractos fueron el metanólico de primordio y el acuoso del cuerpo fructífero, ambos obtenidos por ebullición y de muestras frescas, con  $166.5 \pm 0.10$  y  $113.9 \pm 0.24$   $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ , respectivamente. En general, para la prueba de FRAP los extractos de muestras frescas fueron mayores con respecto a las muestras deshidratadas, con valores entre  $4.87 \pm 0.05$  y  $166.50 \pm 0.10$   $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ . En la prueba de actividad quelante de iones metálicos todos los extractos presentaron actividad. Los mejores extractos de esta prueba fueron el metanólico de micelio y el acuoso del cuerpo fructífero, ambos obtenidos por ebullición y de muestras deshidratadas, con un valor de  $\text{EC}_{50} = 13.17 \pm 0.13$  y  $25.53 \pm 0.80$  mg EAG/L, respectivamente. El valor de  $\text{EC}_{50}$  representa la concentración de la muestra requerida para un efecto quelante del 50 %. Con respecto a las pruebas del poder reductor, todas las muestras fueron dependientes de la concentración. En esta prueba, el mejor extracto fue el acuoso del cuerpo fructífero, obtenido por ebullición, seguido del metanólico de micelio, obtenido a temperatura ambiente, (ambos de muestras deshidratadas) con una absorbancia de  $0.701 \pm 0.034$  y  $0.645 \pm 0.009$ , respectivamente, a una concentración de 100 mg EAG/L. Por último, la actividad reductora de los radicales DPPH y ABTS fue

correlacionada positivamente con la concentración del extracto. Los mejores extractos de la actividad reductora de DPPH y ABTS fueron los metanólicos de muestras deshidratadas, obtenidos a temperatura ambiente, del cuerpo fructífero y primordio ( $EC_{50} = 26.99 \pm 0.47$  y  $22.89 \pm 0.37$  mg EAG/L), respectivamente. El valor de  $EC_{50}$  representa la concentración de la muestra requerida para neutralizar el 50 % de los radicales libres. En cuanto al análisis de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los mejores extractos, se encontró la presencia del ácido metiltartrónico (TR 20.185), al que se le atribuye una parte de la actividad antioxidante presentada en los extractos. Se puede concluir que la actividad antioxidante se debe parcialmente a los polifenoles en conjunto con la presencia de diferentes moléculas o sustancias presentes en los extractos. Asimismo, no se encontró un patrón de comportamiento entre las fases de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*, los polifenoles totales y la actividad antioxidante.



## ABSTRACT

In search of new knowledge about the metabolites produced by fungi and their relation with antioxidant activity, the objective of this research was to evaluate the antioxidant activity of mycelium, primordium and fruiting body of the fungus *Pleurotus ostreatus* developed on wheat straw. Total polyphenols and flavonoids, as well as ferric reducing antioxidant power (FRAP), metal ions chelating activity, reducing power assay and scavenging activity of DPPH and ABTS radicals were evaluated. These tests were carried out with extracts elaborated with fungus in different growth phases and in both, dry and fresh, using solvents with different polarity (water and methanol) and different temperature (room temperature and boiling). The results for total polyphenols obtained in this research showed that the best extract was the methanolic of fresh primordium obtained by boiling, followed by the aqueous extract of the fruiting body obtained at room temperature, with  $12.06 \pm 0.02$  y  $11.36 \pm 0.04$  mg GAE/g, respectively. In the case of flavonoids, in general, they represented a very small percentage of the total polyphenols content, the values ranged from  $0.011 \pm 0.001$  to  $1.04 \pm 0.01$  mg EQ/g. In the case of the different methods of antioxidant activity: in the FRAP method, the best extracts were the methanolic of primordium and the aqueous of the fruiting body, both obtained by boiling and fresh samples, with  $166.5 \pm 0.10$  and  $113.9 \pm 0.24$   $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ , respectively. In general, for the FRAP test the fresh sample extracts were higher with respect to the dry samples, with values between  $4.87 \pm 0.05$  and  $166.50 \pm 0.10$   $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4/\text{g}$ . In the metal ion chelating activity test all extracts showed activity. The best extracts of this test were methanolic of mycelium and the aqueous of the fruiting body, both obtained by boiling and dry samples, with  $\text{EC}_{50} = 13.17 \pm 0.13$  and  $25.53 \pm 0.80$  mg GAE/L, respectively. The  $\text{EC}_{50}$  value represents the sample concentration required for a 50 % chelating effect. In the reducing power tests, all samples were concentration dependent. In this test, the best extract was the aqueous of the fruiting body obtained by boiling, followed by the methanolic of mycelium obtained at room temperature (both from dry samples), with absorbance of  $0.701 \pm 0.034$  and  $0.645 \pm 0.009$ , respectively, at 100 mg GAE/L. It was observed that the DPPH and ABTS radical scavenging activities were positively correlated to the concentration of the extract. The best extracts were methanolic of dried samples obtained at room temperature, of fruiting body

and primordium with  $EC_{50} = 26.99 \pm 0.47$  and  $22.89 \pm 0.37$  mg GAE/L, respectively. The  $EC_{50}$  value represents the concentration of the sample required to neutralize 50 % of the free radicals. The GC Mass analysis of the best extracts revealed the presence of methyltartronic acid (TR 20.185), which is attributed a part of the antioxidant activity. The results suggested that antioxidant activity could be due to polyphenols, but mainly by different molecules or substances present in the extracts. A pattern of behavior between the growth phases of the *Pleurotus ostreatus* fungus, total polyphenols and antioxidant activity was not found.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Radicales libres</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Estrés y daño oxidativo</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Antioxidantes</b>	<b>2</b>
1.3.1 Clasificación de antioxidantes	3
<b>1.4 Compuestos polifenólicos</b>	<b>6</b>
1.4.1 Flavonoides	8
<b>1.5 Actividad antioxidante</b>	<b>9</b>
1.5.1 Determinación de polifenoles	11
1.5.2 Determinación de flavonoides	11
1.5.3 Poder antioxidante reductor de hierro	12
1.5.4 Actividad quelante	13
1.5.5 Poder reductor	13
1.5.6 Reducción del radical DPPH	14
1.5.7 Reducción del radical ABTS	14
<b>1.6 <i>Pleurotus ostreatus</i></b>	<b>15</b>
1.6.1 Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i>	18
1.6.2 Producción de metabolitos	19
1.6.3 Contenido nutricional de <i>Pleurotus ostreatus</i>	20
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>22</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>32</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>32</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Objetivos particulares</b>	<b>33</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>6.1 Organismo de estudio</b>	<b>35</b>
<b>6.2 Condiciones de cultivo</b>	<b>35</b>
<b>6.3 Obtención de los extractos</b>	<b>35</b>
<b>6.4 Determinación de polifenoles totales</b>	<b>36</b>
<b>6.5 Determinación de flavonoides</b>	<b>36</b>
<b>6.6 Poder antioxidante reductor de hierro</b>	<b>37</b>
<b>6.7 Actividad quelante de iones metálicos</b>	<b>37</b>
<b>6.8 Poder reductor</b>	<b>38</b>

6.9	Actividad reductora del radical DPPH _____	38
6.10	Actividad reductora del radical ABTS _____	38
6.11	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas _____	39
6.12	Análisis estadístico _____	39
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____</b>	<b>40</b>
7.1	Organismo de estudio _____	40
7.2	Determinación de polifenoles totales _____	41
7.3	Determinación de flavonoides _____	44
7.4	Poder antioxidante reductor de hierro _____	46
7.5	Actividad quelante de iones metálicos _____	48
7.6	Poder reductor _____	50
7.7	Actividad reductora del radical DPPH _____	54
7.8	Actividad reductora del radical ABTS _____	56
7.9	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas _____	58
7.10	<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC 32783 comparado con hongos comerciales _____	61
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES _____</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES _____</b>	<b>65</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>66</b>
<b>11.</b>	<b>APÉNDICES _____</b>	<b>77</b>
	Apéndice A _____	77
	Apéndice B _____	78
	Apéndice C _____	79
	Apéndice D _____	79
	Apéndice E _____	80
	Apéndice F _____	80
	Apéndice G _____	81
	Apéndice H _____	81
	Apéndice I _____	82
	Apéndice J _____	82
	Apéndice K _____	83
	Apéndice L _____	83

<b>Apéndice M</b>	<b>84</b>
<b>Apéndice N</b>	<b>84</b>
<b>Apéndice O</b>	<b>85</b>
<b>Apéndice P</b>	<b>85</b>
<b>Apéndice Q</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Compuesto polifenólico simple (catecol) (Mercado-Mercado y col. 2013) .....	6
Figura 2. Clasificación de fitoquímicos (Liu 2004) .....	7
Figura 3. Estructura básica de los flavonoides (Morales y col. 2009) .....	9
Figura 4. Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu .....	11
Figura 5. Reacción de un flavonoide (rutina) con tricloruro de aluminio .....	12
Figura 6. Reacción de la reducción del complejo de tripiridiltriazina (TPTZ) con Fe (III) y un antioxidante	12
Figura 7. Formación del complejo colorido del ion $Fe^{2+}$ con ferrozina .....	13
Figura 8. Formación del complejo colorido de ferrocianuro de potasio y $Fe^{2+}$ .....	13
Figura 9. Reducción del radical DPPH por antioxidantes .....	14
Figura 10. Formación del radical ABTS y su reacción en presencia de un antioxidante .....	15
Figura 11. Fase vegetativa y reproductiva de <i>Pleurotus</i> (Sánchez 1998).....	17
Figura 12. Ciclo de vida del hongo (Stamets y Chilton 1983) .....	19
Figura 13. Estrategia experimental para la determinación de polifenoles y flavonoides totales y la evaluación de la actividad antioxidante del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	34
Figura 14. Micelio del hongo <i>Plurotus ostreatus</i> .....	40
Figura 15. Primordios del hongo <i>Pleurotus otreatus</i> .....	40
Figura 16. Cuerpo fructífero del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	40
Figura 17. Polifenoles totales de hongos deshidratados.....	43
Figura 18. Polifenoles totales de hongos frescos .....	43
Figura 19. Flavonoides de hongos deshidratados .....	45
Figura 20. Flavonoides de hongos frescos.....	45
Figura 21. Poder antioxidante reductor de hierro de hongos deshidratados .....	47
Figura 22. Poder antioxidante reductor de hierro de hongos frescos.....	47
Figura 23. Actividad quelante de iones metálicos de hongos deshidratados.....	49
Figura 24. Actividad quelante de iones metálicos de hongos frescos .....	50
Figura 25. Poder reductor de extractos acuosos de hongos deshidratados.....	52
Figura 26. Poder reductor de extractos metanólicos de hongos deshidratados .....	52
Figura 27. Poder reductor de extractos acuosos de hongos frescos .....	53
Figura 28. Poder reductor de extractos metanólicos de hongos frescos.....	53
Figura 29. Actividad reductora del radical DPPH de hongos deshidratados .....	55
Figura 30. Actividad reductora del radical DPPH de hongos frescos.....	55
Figura 31. Actividad reductora del radical ABTS de hongos deshidratados.....	57
Figura 32. Actividad reductora del radical ABTS de hongos frescos .....	57
Figura 33. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto acuoso del cuerpo fructífero deshidratado, obtenido a temperatura ambiente .....	60
Figura 34. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto metanólico del cuerpo fructífero deshidratado, obtenido a temperatura ambiente .....	60
Figura 37. Curva estándar de ácido gálico.....	77
Figura 38. Curva estándar de quercetina .....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Diferentes especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Se presentan los radicales más reactivos y sus pro-radicales o moléculas precursoras</i> .....	2
<i>Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes, según su origen</i> .....	6
<i>Tabla 3. Composición química proximal de la harina integral de P. ostreatus ATCC 32783</i> .....	21
<i>Tabla 4. Ácidos fenólicos de hongos comestibles</i> .....	30
<i>Tabla 5. Compuesto encontrado en extractos de hongos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</i> .....	59
<i>Tabla 6. Concentraciones de ácido gálico y absorbancias obtenidas para la curva estándar de ácido gálico</i> .....	77
<i>Tabla 7. Concentraciones de quercetina y absorbancias obtenidas para la curva estándar de quercetina</i> ...	78
<i>Tabla 8. Polifenoles totales de hongos deshidratados</i> .....	79
<i>Tabla 9. Polifenoles totales de hongos frescos</i> .....	79
<i>Tabla 10. Flavonoides de hongos deshidratados</i> .....	80
<i>Tabla 11. Flavonoides de hongos frescos</i> .....	80
<i>Tabla 12. Poder antioxidante reductor de hierro de hongos deshidratados</i> .....	81
<i>Tabla 13. Poder antioxidante reductor de hierro de hongos frescos</i> .....	81
<i>Tabla 14. Actividad quelante de iones metálicos de hongos deshidratados</i> .....	82
<i>Tabla 15. Actividad quelante de iones metálicos de hongos frescos</i> .....	82
<i>Tabla 16. Poder reductor de hongos deshidratados</i> .....	83
<i>Tabla 17. Poder reductor de hongos frescos</i> .....	83
<i>Tabla 18. Actividad reductora del radical DPPH de hongos deshidratados</i> .....	84
<i>Tabla 19. Actividad reductora del radical DPPH de hongos frescos</i> .....	84
<i>Tabla 20. Actividad reductora del radical ABTS de hongos deshidratados</i> .....	85
<i>Tabla 21. Actividad reductora del radical ABTS de hongos frescos</i> .....	85

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Radicales libres**

Desde el punto de vista químico, un radical libre es una molécula o fragmento de molécula que posee uno o más electrones desapareados y en capacidad de aparearse en el orbital más externo (Morales y col. 2009; Okoro 2012; Kalita y col. 2013). Desde el molecular, los radicales libres son pequeñas moléculas difusibles producidas en la cadena respiratoria mitocondrial, en la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal, en los cloroplastos y en las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (Venereo 2002).

Los radicales libres recorren el organismo o cualquier otro sistema con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, con el robo de un electrón de las moléculas estables. Cuando el radical libre roba el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en otro radical libre, por quedar con un electrón desapareado (Morales y col. 2009).

Los radicales libres se generan por medio de reacciones bioquímicas de óxido reducción, generalmente a partir de oxígeno en los organismos vivos. Dichas reacciones, nominadas como redox, se producen por el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, en una reacción inflamatoria y se relacionan con la generación de especies reactivas al oxígeno (ERO) (Morales y col. 2009). Estas ERO centran su reactividad en un átomo de oxígeno. Ahora bien, las especies cuya reactividad se centra en átomos del nitrógeno se denominan especies reactivas del nitrógeno (ERN) (Valko y col. 2007).

Las ERO y ERN son las responsables de generar diversas patologías humanas. Las especies reactivas incluyen no solo a los radicales libres, sino también a compuestos no radicales que puedan participar en la formación de los mismos (tabla 1) (Morales y col. 2009).



**Tabla 1. Diferentes especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Se presentan los radicales más reactivos y sus pro-radicales o moléculas precursoras**

<b>Principales especies reactivas del oxígeno y nitrógeno</b>	
<b>Radical libre</b>	<b>Pro-radical</b>
Superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
Radical peroxilo ( $R-O_2^{\bullet}$ )	Ácido hipobromoso ( $HOBr$ )
Radical alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ )	Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )
Óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ )	
Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ )	

(Morales y col. 2009)

## 1.2 Estrés y daño oxidativo

El estrés oxidativo es un desbalance en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación establecida como normal (Morales y col. 2009). El estrés oxidativo puede ser provocado por factores endógenos (como las especies reactivas al oxígeno) y factores exógenos (fumar, radiación ionizante, contaminación, solventes orgánicos, pesticidas, entre otros). Conforme pasa el tiempo, el estrés oxidativo es capaz de atacar ácidos nucleicos, proteínas, enzimas y otras moléculas pequeñas, causándoles la pérdida de su estructura y función (Martínez 2005; Limón-Pacheco y Gonsebatt 2009; Adebayo y col. 2012).

## 1.3 Antioxidantes

Los radicales libres y ERO se producen constantemente en el cuerpo humano durante los procesos metabólicos. Por ello, la célula ha desarrollado un sistema complejo de defensa que limita la exposición de estos agentes que reciben el nombre de antioxidantes (Morales y col. 2009).

Un antioxidante, generalmente, es una sustancia que impide las reacciones de oxidación o inhibe reacciones promovidas por el oxígeno o peróxidos. Muchas de estas se usan para conservar los productos (por ejemplo, grasas, aceites, productos alimenticios y jabones) y para retardar la rancidez (Huang y col. 2005). Desde el punto de vista químico, un antioxidante evita o retrasa la oxidación de otra sustancia. Esta reacción se realiza mediante la reducción del agente oxidante, para ello los antioxidantes deben tener una estructura química que permita la donación de hidrogeniones o la deslocalización de electrones (Halliwell y col. 1995; Vit y col. 2008; Niki 2010). Los antioxidantes son

fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo y las relaciones estructurales entre diferentes partes de su estructura química (Morales y col. 2009).

### 1.3.1 Clasificación de antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser clasificados, en general, por su mecanismo de acción en primarios, secundarios (Casimir 2008) y terciarios (Velázquez y col. 2004; Morales y col. 2009). Algunos antioxidantes exhiben más de un mecanismo de actividad y son frecuentemente referidos con el nombre de antioxidantes con función múltiple (Casimir 2008).

*-Antioxidantes primarios.* Estos antioxidantes son llamados también rompedores de cadenas. Son aceptores de radicales libres que retrasan o inhiben la iniciación del paso a la autoxidación (Velázquez y col. 2004; Casimir 2008; Morales y col. 2009). La iniciación de la autoxidación ocurre cuando una molécula de hidrógeno  $\alpha$ -metilénico es abstraída de un lípido insaturado para formar un lípido (alquilo) radical (R) (ecuación 1).



Este lípido altamente reactivo puede reaccionar con oxígeno para formar un radical peroxi (ROO•) en la reacción de propagación (ecuación 2).



Durante la propagación, los radicales peroxi reaccionan con un lípido para formar un hidroperóxido y un nuevo radical lipídico inestable (ecuación 3).



Este radical lipídico reaccionará con un oxígeno para producir otro radical peroxi, resultando un ciclo (ecuación 4).



Los hidroperóxidos son inestables y se pueden degradar para producir radicales que además pueden acelerar la reacción de propagación (ecuaciones 5 y 6).



La degradación de hidroperóxido conduce a olores y sabores indeseables y se asocia con la rancidez en etapas posteriores de oxidación. Los antioxidantes primarios reaccionan con los lípidos y radicales peroxi y los convierten en más estables. Los antioxidantes primarios donan átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos y producen derivados lipídicos y

radicales antioxidantes (A•) más estables y menos disponibles para promover aún más la autoxidación. Asimismo, hay más afinidad de los antioxidantes primarios, donadores de hidrógeno, por radicales peroxi que por los lípidos. Por lo tanto, los antioxidantes primarios eliminan a los radicales libres peroxi y oxi, formados durante la propagación (ecuaciones 2 y 4) y derivación (ecuaciones 5 y 6) de autoxidación. Además, los antioxidantes primarios, también, interactúan directamente con radicales lipídicos (ecuación 9).



El radical antioxidante producido por la donación de hidrógeno presenta muy baja reactividad con los lípidos. Esta baja reactividad reduce la tasa de propagación, desde la reacción del radical antioxidante con oxígeno o lípidos. El radical antioxidante se estabiliza por deslocalización de un electrón impar alrededor de un anillo fenólico para formar híbridos estables. Los radicales antioxidantes, también, participan en las reacciones de terminación con peroxi (ecuación 10), oxi (ecuación 11) y otros radicales antioxidantes (ecuación 12). Finalmente, la formación de dímeros (dimerización), prominente en grasas y aceites, indican reacciones de terminación de los radicales fenólicos antioxidantes.



(Casimir 2008)

*-Antioxidantes secundarios.* También llamados preventivos o tipo 2. Estos antioxidantes bajan la velocidad de oxidación por diferentes acciones, pero no convierten los radicales libres en productos estables. Los antioxidantes secundarios, también de acuerdo con su estructura química, quelan metales prooxidantes y los desactivan. Asimismo, reponen hidrógeno a los antioxidantes primarios, descomponen hidroperóxidos a especies no radicalarias, desactivan el oxígeno singulete, absorben radiación ultravioleta y actúan como eliminadores de oxígeno (Casimir 2008).

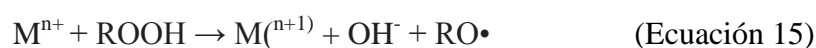
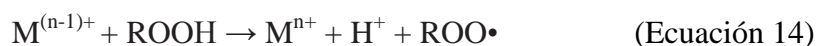
a) *Queladores*

Metales pesados con dos o tres estados de valencia (Fe, Cu, Mn, Cr, Ni, V, Zn y Al) promueven la oxidación, estos actúan como catalizadores de radicales libres. Esta

transición de metales activa redox transfiere electrones durante cambios en estados de oxidación. Así, se han propuesto dos mecanismos de oxidación por metales. El primero, los metales interactúan con hidroperóxidos o actúan directamente con moléculas lipídicas (ecuación 13). El segundo, los metales promocionan la oxidación por la interacción directa con lípidos insaturados y en consecuencia disminuye la energía de activación de la iniciación del paso de autocatálisis (Casimir 2008).



Se sabe que los metales interactúan con hidroperóxidos y promueven la oxidación. Por otra parte, las formas de un complejo metal-hidroperóxido se descomponen para producir radicales libres (ecuaciones 14 y 15). Los metales mejoran la tasa de descomposición de hidroperóxidos y la generación de radicales libres. Son posibles dos reacciones metal-hidroperóxido (Casimir 2008).



b) *Eliminadores de oxígeno y agentes reductores*

El ácido ascórbico, ascorbil palmitato, ácido eritórbito, eritorbato de sodio y sulfitos previenen la oxidación por la eliminación de oxígeno la donación de átomos de hidrógeno (agentes reductores) (Casimir 2008).

c) *Eliminadores del oxígeno singulete*

El oxígeno singulete es una molécula con alta energía. Es responsable de la fotooxidación de grasas insaturadas y la generación subsecuente de hidroperóxidos. Los eliminadores del oxígeno singulete (por ejemplo los carotenoides,  $\beta$ -carotenos, licopenos y luteína) agotan el exceso de energía y disipan la energía en forma de calor (Casimir 2008).

-*Antioxidantes terciarios*. Reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre estos antioxidantes se encuentran las enzimas reparadoras del ácido desoxirribonucleico (ADN) (endonucleasas y exonucleasas) y la metionina sulfóxido reductasa (Velázquez y col. 2004; Morales y col. 2009).

En la clasificación de antioxidantes, también, se maneja la clasificación basada según su origen y características bioquímicas (tabla 2), ya que los seres humanos han desarrollado sistemas altamente complejos de antioxidantes que trabajan sinérgicamente en

combinación con otros para proteger las células contra los daños causados por los radicales libres (Rahman 2007).

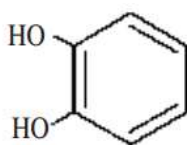
**Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes, según su origen**

<b>Origen</b>	<b>Acción</b>	<b>Tipo</b>
<b>Exógenos</b> Vitamina E Vitamina C $\beta$ -carotenos Flavonoides, licopenos	-Neutraliza el oxígeno singulete -Captura radicales libres hidroxilo -Captura O <sub>2</sub> -Neutraliza peróxidos	Secundarios
<b>Endógenos enzimáticos</b> Superóxido dimutasa (SOD) Catalasa (Cat) Glutación peroxidasa (GPx)	-Regeneran la forma oxidada de la vitamina E -Neutraliza el oxígeno singulete	Primarios
<b>No enzimáticos</b> Glutación Coenzima Q Ácido tióctico	-Cofactor -Cobre, sodio, manganeso -Hierro -Selenio -Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células -Transportadores de materiales (transferrina y ceruplasmina)	Primarios y secundarios

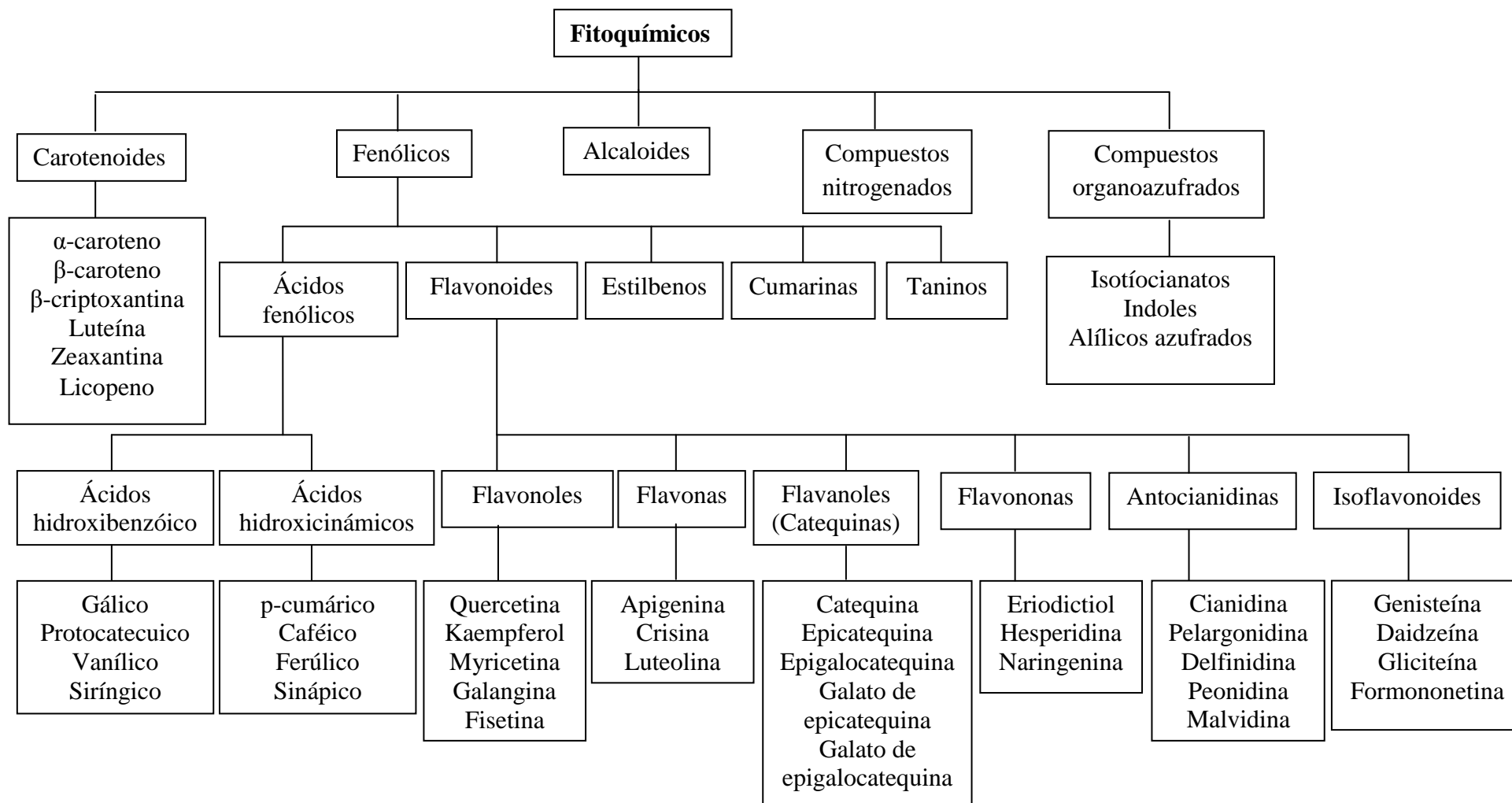
Morales y col. 2009

#### 1.4 Compuestos polifenólicos

Los polifenoles poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo (figura 1). Existen alrededor de 8000 compuestos polifenólicos identificados y la mayoría de estos poseen una estructura de tres anillos, dos aromáticos (A y B) y uno heterociclo oxigenado (C) (Mercado-Mercado y col. 2013). Generalmente, los compuestos polifenólicos se clasifican en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos (figura 2) (Liu 2004). Los polifenoles son metabolitos secundarios producidos en las plantas, frutos y vegetales, que proporcionan funciones esenciales en el crecimiento de las plantas. Asimismo, actúan en el mecanismo de defensa en contra de patógenos, parásitos, depredadores, además de contribuir en el color de las plantas (Liu 2004).



**Figura 1.** Compuesto polifenólico simple (catecol) (Mercado-Mercado y col. 2013)



**Figura 2.** Clasificación de fitoquímicos (Liu 2004)

Con respecto a los compuestos polifenólicos en la dieta, estos pueden proveer beneficios a la salud y asociarse con la disminución de enfermedades crónicas (Liu 2004). Esto se fundamenta en su capacidad para secuestrar radicales libres (antioxidante) y justificar sus acciones vasodilatadores, vasoprotectoras, antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas. Sin embargo, el potencial funcional de los compuestos polifenólicos está supeditado al consumo de ellos (Lui 2004; Mercado-Mercado y col. 2013).

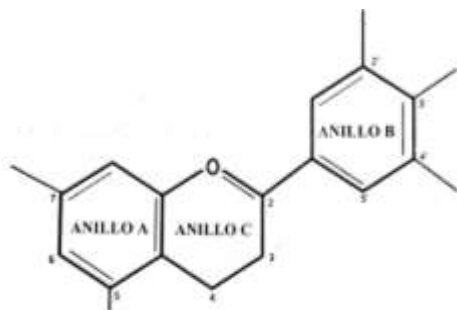
Para que un polifenol se defina como antioxidante debe satisfacer dos condiciones: primera cuando esté presente en bajas concentraciones relativas al sustrato a oxidar debe detener, retardar o prevenir la autooxidación, es decir, ser mediador de la oxidación causada por radicales libres. La segunda, el radical formado como resultado debe ser estable y no participar en las reacciones en cadena de oxidación (Rice-Evans y col. 1996).

#### **1.4.1 Flavonoides**

Los flavonoides son potentes antioxidantes, pertenecientes al grupo de los polifenoles. Los flavonoides se consideran nutrimentos esenciales ya que son imposibles de sintetizar en el cuerpo humano (Morales y col. 2009). Recientemente, los flavonoides, presentes en diversas plantas principalmente en las hojas, han adquirido un considerable interés debido a sus efectos benéficos en la salud humana. La capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes depende de su estructura molecular. La posición de los grupos hidroxilos y otras características en su estructura química son significativas para neutralizar los radicales libres y la actividad antioxidante. Así, los flavonoides pueden neutralizar los radicales peroxilo, ser eficaces inhibidores de la peroxidación lipídica y ser quelantes de los metales redox-activos (Rahman 2007; Kalita y col. 2013).

La estructura química básica de los flavonoides consta de dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono heterocíclico (figura 3). La oxidación de la estructura da lugar a distintas familias de flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas o flavanoles, antocianos e isoflavonas). Las modificaciones químicas que pueden sufrir los compuestos de cada familia dan lugar a los más de cinco mil compuestos identificados. La función de los flavonoides en los vegetales es antioxidante,

xenobiótico, protector de depredadores y atrayente para la polinización (Morales y col. 2009).



**Figura 3.** Estructura básica de los flavonoides (Morales y col. 2009)

### 1.5 Actividad antioxidante

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto de inhibir la degradación oxidativa (Roginsky y Lissi 2005). En métodos de determinación de actividad antioxidante *in vitro* de un compuesto, mezcla o alimento, la actividad antioxidante se determina frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, en donde la pérdida de color de un radical ocurre de forma proporcional con la concentración de la muestra a evaluar. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizada *in vitro* muestran tan solo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski y col. 2005).

Los antioxidantes naturales se consideran multifuncionales y su actividad depende de varios factores como la multiplicidad y heterogeneidad del extracto, condiciones experimentales y principales mecanismos de reacción. En general, la eficacia de un antioxidante se basa en los fenómenos interfaciales y la distribución de los componentes de las fases hidrofílicas y lipofílicas (Gioti y col. 2009). Las propiedades antioxidantes de los extractos no pueden ser evaluados por un solo método debido a la complejidad de los compuestos (Gioti y col. 2009). La medición de la actividad antioxidante en un ensayo individual refleja solo la reactividad química bajo ciertas condiciones de la prueba, por lo que es inapropiado generalizar los datos de un método de medición en particular como indicador de la actividad antioxidante total (Huang y col. 2005). Por lo que un profundo ensayo antioxidante de extractos debe implicar varios métodos de actividad (Gioti y col. 2009).



Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se puede dividir en dos categorías. La primera se basa en la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). La segunda transfiere un solo electrón (ET). El método HAT usa un compuesto generador de radicales libres, un indicador molecular oxidable y un antioxidante. Mientras que el ET involucra una reacción redox con el oxidante como un indicador del final de la reacción (Huang y col. 2005). Se enlistan a continuación algunos de los métodos para la evaluación de la actividad antioxidante.

#### Métodos *in vitro*

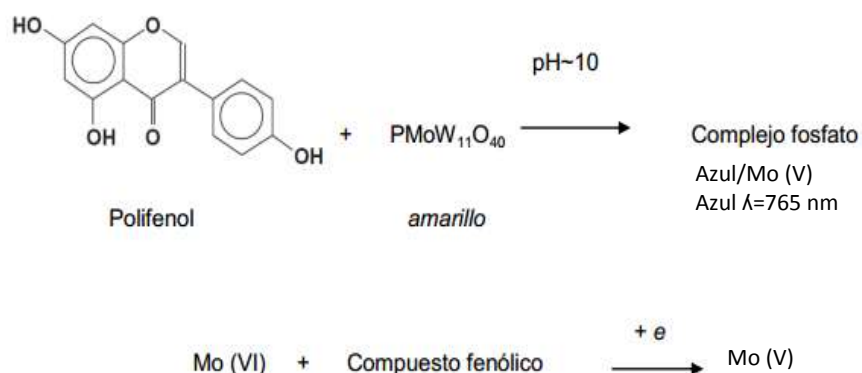
- Método de inhibición de consumo de oxígeno (IUO) (Huang y col. 2005).
- Inhibición de autooxidación lipídica (Huang y col. 2005).
- Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC) (Huang y col. 2005).
- Método de blanqueamiento de crocina (Huang y col. 2005).
- Parámetro total de atrapamiento de radicales por antioxidantes (Huang y col. 2005).
- Fenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu (Huang y col. 2005).
- Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) (Huang y col. 2005).
- Potencial antioxidante total con Cu(II) (Huang y col. 2005).
- Capacidad de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Huang y col. 2005).
- Capacidad de reducción del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Re y col. 1999).
- Poder reductor (Yen y Chen 1995).
- Sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) (Kamal-Eldin y Pokorny 2005).

#### Métodos *in vivo*

- Evaluación del efecto citotóxico (Freshney 1992).
- Absorción de rojo neutro (NRU) (Nadhlala 2010).
- Evaluación de oxidación de lípidos *in vivo* (el Haffidi y Baños 1997).

### 1.5.1 Determinación de polifenoles

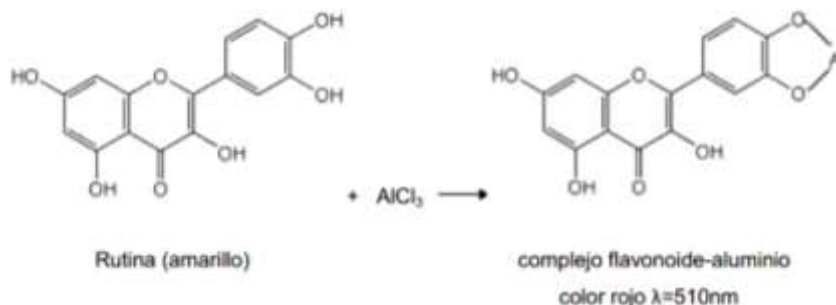
La reacción entre los polifenoles y el reactivo de Folin Ciocalteu se realiza bajo condiciones básicas (pH 10). Se sabe que la disociación de protones fenólicos permite la formación de un anión fenolato, que es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu. Como resultado de la reacción, se forma un complejo azul entre el fenolato y el reactivo, independientemente de la estructura del compuesto fenólico (figura 4). En esta reacción, el molibdeno es fácil de reducir y, asimismo, se genera la reacción de transferencia de electrones entre los reductores y Mo (VI) (Huang y col. 2005).



**Figura 4.** Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu

### 1.5.2 Determinación de flavonoides

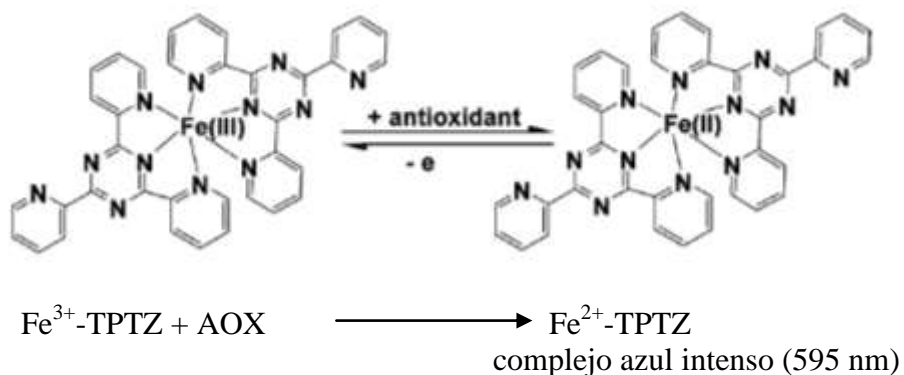
Los flavonoides se determinaron por un método colorimétrico en el que la formación de complejos ácidos estables se forma con el grupo ceto C-4 o bien con los grupos hidroxilo de C-3 o C-5 de los flavonoides con cloruro de aluminio. En esta reacción los grupos hidroxilo son relevados por desplazamiento batocrómico causado por la reacción con cloruro de aluminio (figura 5) (Kalita y col. 2013).



**Figura 5.** Reacción de un flavonoide (rutina) con tricloruro de aluminio

### 1.5.3 Poder antioxidante reductor de hierro

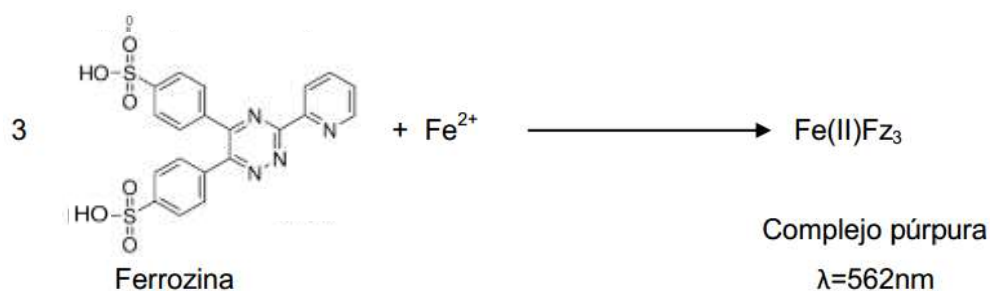
La prueba del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) está basada en la capacidad reductora (transferencia de un electrón desde la molécula antioxidante a la oxidante), es decir, determina la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra (figura 6). A pH bajo y en presencia de un reductor (antioxidante) el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) con Fe (III) se reduce a la forma ferrosa Fe (II). Esta reacción genera un intenso color azul con una absorción máxima a 595 nm, que permite ser cuantificado espectrofotométricamente por interpolación en una recta de calibrado de un patrón. Asimismo, se mide el incremento de absorbancia a los 10 minutos de comenzar la reacción (Benzie y Strain 1996).



**Figura 6.** Reacción de la reducción del complejo de tripiridil triazina (TPTZ) con Fe (III) y un antioxidante

### 1.5.4 Actividad quelante

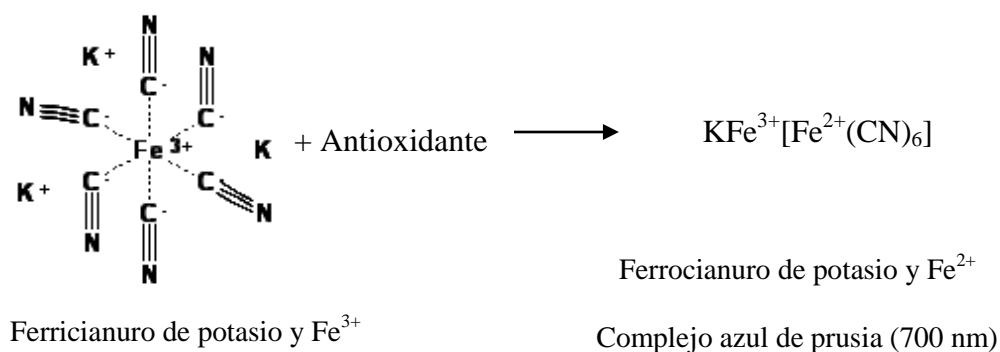
El  $\text{Fe}^{2+}$  forma un complejo con tres moléculas de ferrozina de color púrpura que presenta una absorbancia a 562 nm. En presencia del antioxidante el  $\text{Fe}^{2+}$  puede quelarse y la intensidad de color púrpura del complejo con ferrozina disminuye y es proporcional a la concentración del antioxidante en la muestra de interés (figura 7) (Xie y col. 2008).



**Figura 7.** Formación del complejo colorido del ion  $\text{Fe}^{2+}$  con ferrozina

### 1.5.5 Poder reductor

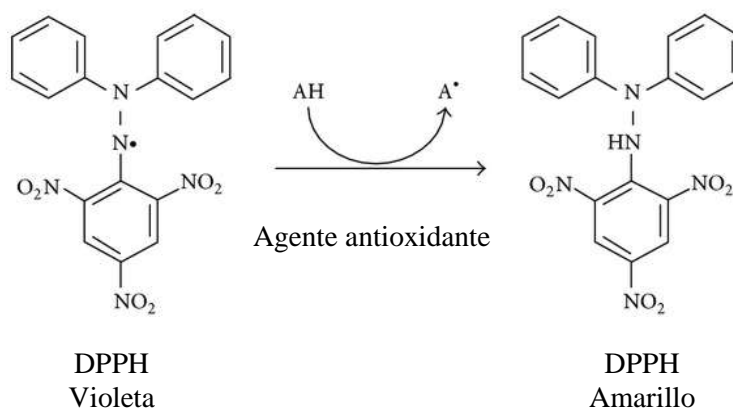
El poder reductor es dependiente de la concentración. Cuando el ferricianuro de potasio o hexacianoferrato de potasio reacciona con el cloruro férrico en presencia de un antioxidante se obtiene como producto ferrocianuro de potasio y cloruro ferroso. La presencia de reductores origina la conversión del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricianuro a la forma ferrosa (complejo azul de prusia), en este método (Kalita y col. 2013). El complejo colorido se absorbe a una longitud de onda de 700 nm (figura 8).



**Figura 8.** Formación del complejo colorido de ferrocianuro de potasio y  $\text{Fe}^{2+}$

### 1.5.6 Reducción del radical DPPH

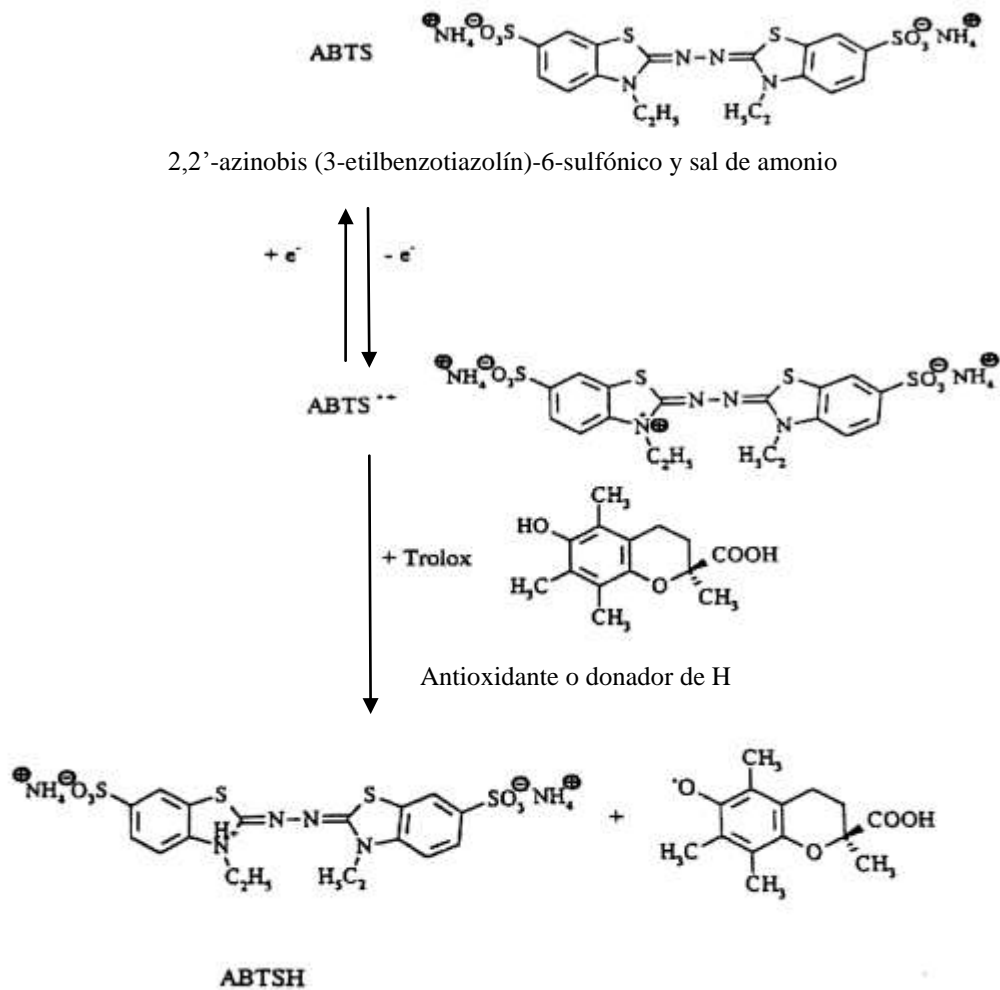
El radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es reducido por los antioxidantes. El color del radical DPPH cambia de color violeta a amarillo después de la reducción, el radical puede ser cuantificado a 517 nm por el decremento de la absorbancia. El grado de decoloración indica el potencial reductor de la muestra sobre los radicales libres, por la habilidad de la donación de hidrógenos (figura 9) (Kalita y col. 2013).



**Figura 9.** Reducción del radical DPPH por antioxidantes

### 1.5.7 Reducción del radical ABTS

El radical ABTS se genera a partir de su precursor el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible a 734 nm. Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación in vivo, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68V) por ejemplo diversos compuestos fenólicos. El final de la reacción lo marca el antioxidante empleado, generalmente se emplean tiempos cortos. Una de las ventajas de este ensayo es la realización de pruebas en muestras hidrosolubles y liposolubles, con el disolvente apropiado en cada caso (figura 10) (Prior y col. 2005).



**Figura 10.** Formación del radical ABTS y su reacción en presencia de un antioxidante

### 1.6 *Pleurotus ostreatus*

*Pleurotus* es un hongo saprofito o parásito débil, descomponedor de madera. Este tipo de hongo crece abundantemente sobre aliso, balso y arce (Stamets y Chilton 1983). La palabra *Pleurotus* (del griego pleuro) significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo y *ostreatus* (del latín ostrea) significa en forma de ostra, refiriéndose a la apariencia (Stamets y Chilton 1983). *Pleurotus* pertenece a la clase de los basidiomicetos, comprende a los hongos superiores, cuya principal característica es la presencia de basidios sobre los cuales se producen las basidiosporas (Kirk y col. 2001; Rojas 2013). Entre las numerosas especies existentes de

*Pleurotus*, las más conocidas son *ostreatus*, *sajor-caju*, *florida*, *cornucopiae*, *eryngii*, *tuber regium*, *pulmonaris* y *djamour* (Mendoza y Díaz 1981, Alexopoulos y Mims 1996, Pardo 1995).

A *Pleurotus ostreatus* se le denomina champiñón ostra (Ciappini y col. 2004), gírgolas, orellanas u hongo ostra (Suárez y Nieto 2013) oreja, hongo oreja, oreja de cazahuate o izote, oreja de judas, pero los cultivadores de hongos y en los mercados, en México, lo nombran seta (Guzmán 1977; Michel y col. 2010). La especie *P. ostreatus* ocupa el segundo lugar dentro de la clasificación de los hongos más cultivados, a nivel mundial (Sánchez 2010; Suárez y Nieto 2013).

Asimismo, a *Pleurotus ostreatus* se considera un hongo cosmopolita, es decir, se encuentra en la mayoría de los países. Crece de forma cespitosa sobre troncos, ramas o árboles muertos (Sierra-Fernández 2002; Gaitán-Hernández y col. 2004). Este hongo presenta crecimiento micelial rápido, una sobresaliente capacidad de colonización saprófita, técnica de cultivo sencillo y económico (Breene 1990). El género *Pleurotus* comprende especies, comúnmente, de color blanco, amarillento, rosado, a veces grisáceo o de color oscuro, según la intensidad de la luz (Guinberteau 1990). *Pleurotus ostreatus* crece en climas templados, a una temperatura óptima de crecimiento de 25 °C. Otras especies de *Pleurotus* crecen en climas semitropicales en temperaturas entre 15 y 28 °C (Breene 1990).

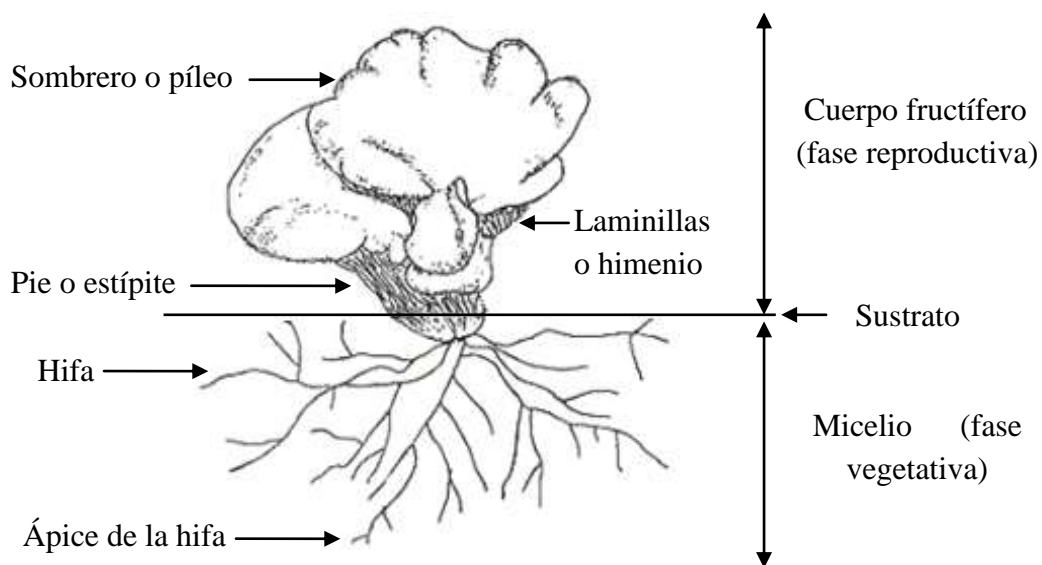
Las cepas de *Pleurotus ostreatus* están disponibles en almacenamientos privadas y comerciales. The American Type Culture Collection (ATCC) facilita la venta de cepas a población educacional y de investigación. ATCC tiene cultivos de reserva de cepas salvajes y domesticadas (Stamets y Chilton 1983).

En general, *Pleurotus* muestra una sombrilla o píleo y un pie o estípote. Se identifican laminillas en la cara inferior de la sombrilla abierta (himenio). Las laminillas son longitudinalmente decurrentes sobre la base del estípote. El píleo, donde se encuentran las laminillas, es excéntrico cuando crece en superficies verticales y central cuando crece en camas. La superficie del píleo se caracteriza por una consistencia lisa y brillante. En tiempo húmedo se vuelve ligeramente viscosa. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, de forma cilíndrica y lisas (Guinberteau 1990; Cohen y col. 2002).

La forma de *Pleurotus* depende de la edad, primero es abombada y finalmente puede llegar a ser plana, de embudo, de pétalo de flor o de ostra (Cardona 2001; Sierra-

Fernández 2002). Las hifas establecen gradualmente una asociación esférica de micelio de uno a dos milímetros (nódulos iniciales o secundarios), de esta forma se crean pequeños cuerpos que dan origen a los primordios y al crecer a los cuerpos fructíferos (Herrera y Ulloa 1998; Kües y Liu 2000). Su tamaño, regularmente, es de 4 a 13 cm de diámetro, aunque ocasionalmente puede presentar tamaños mayores de acuerdo con las condiciones de fructificación (Cardona 2001).

En los hongos macroscópicos existen dos fases de crecimiento (figura 11), la fase vegetativa o micelial y la fase reproductiva, en la cual se desarrollan los cuerpos fructíferos. El crecimiento vegetativo está en contacto directo con el sustrato (Sánchez 1998). La fase vegetativa es filamentosa, constituida por un conjunto de hifas que se denomina micelio. El micelio desempeña la función de adquirir y distribuir los nutrientes, asimismo, crear y formar la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Herrera y col. 1998).



**Figura 11.** Fase vegetativa y reproductiva de *Pleurotus* (Sánchez 1998)

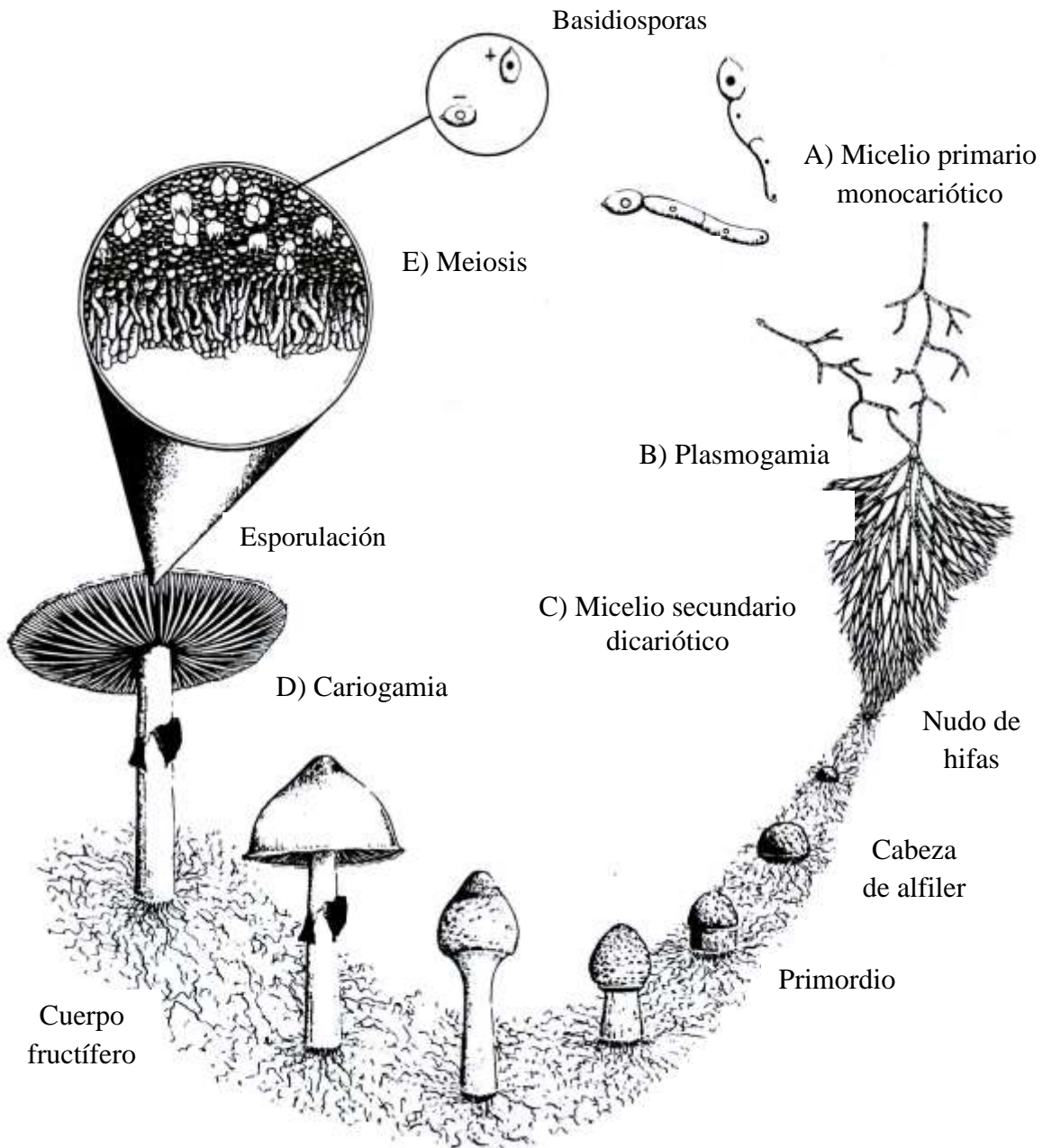


### 1.6.1 Ciclo de vida de *Pleurotus*

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales, el homotalismo y el heterotalismo. En el homotalismo los hongos son autocompatibles, es decir, la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio. En el heterotalismo son necesarios dos micelios para su reproducción, con lo que se asegura que las células diploides (basidios) produzcan progenie meiótica recombinante (basidiosporas).

El género *Pleurotus* está incluido dentro del último modelo, en el que las basidiosporas con un núcleo germinan y dan origen al micelio primario monocariótico (A). Posteriormente, dos micelios primarios compatibles se fusionan (plasmogamia) (B). Con la fusión de los dos micelios primarios, se forma el micelio secundario dicariótico y se hacen presentes las fíbulas (C). A partir del micelio secundario se forma el cuerpo fructífero y la fusión nuclear (cariogamia), ocurre en los basidios encontrados en las laminillas del cuerpo fructífero (D). Finalmente, durante la meiosis se da origen a cuatro basidiosporas uninucleadas, estas son expulsadas al medio ambiente. Las basidiosporas son capaces de germinar y producir micelio monocariótico, esto reinicia el ciclo de vida del hongo (figura 12). La condición monocariótica y dicariótica del micelio se puede distinguir por la presencia de fíbulas (estructuras especializadas que permiten la distribución de los núcleos en las células hijas) en el dicarion y su ausencia en el monocarion (Koltin y col.1972; Ramírez y col. 2000).

En el ciclo de vida del hongo, el cuerpo fructífero aparece brevemente. Durante el poco tiempo de fructificación, el micelio se encuentra en un estado de crecimiento rápido, obtiene nutrientes y forma densas masas similares a las esferas (primordio), que eventualmente agrandan la estructura del hongo (Stamets y Chilton 1983).



**Figura 12.** Ciclo de vida del hongo (Stamets y Chilton 1983)

### 1.6.2 Producción de metabolitos

Los hongos producen una amplia gama de metabolitos. La mayoría de estos son requeridos por el hongo para su crecimiento y metabolismo (metabolitos primarios). También, los hongos producen compuestos que no se consideran esenciales para su crecimiento (metabolitos secundarios) (Wainwright 1992).

Los metabolitos secundarios se producen cuando el hongo ya no crece o se encuentra en una fase estacionaria. Dentro de estos se incluyen un sinnúmero de compuestos decisivos para la medicina, por ejemplo, los antibióticos. Alternativamente, los metabolitos fúngicos pueden clasificarse en metabolitos generales (producidos por una diversidad de organismos) y metabolitos especializados (producidos por un número restringido de organismos). Entre los principales usos biotecnológicos de la producción de metabolitos secundarios de hongos está la producción de ácidos orgánicos, por fermentación. Dentro de los ácidos orgánicos producidos por los hongos destacan el ácido cítrico, glucónico, itacónico y gálico (Wainwright 1992).

### **1.6.3 Contenido nutricional de *Pleurotus ostreatus***

Los hongos se han considerado como el alimento ideal, debido a su contenido de nutrientes para humanos y animales (Sánchez y Díaz-Godínez 2004). Los factores que han inducido al hombre para apreciar el valor nutricional son su consistencia carnosa, fácil digestión y exquisito sabor. Los hongos aportan pocas calorías, en términos relativos, que sacia enseguida, y por ello su preferencia en la alimentación moderna (Sánchez y Mata 2012).

La especie *Pleurotus ostreatus* es una excelente fuente de proteína, debido a que contiene cerca del 40 % de aminoácidos esenciales. Entre estos se pueden mencionar la isoleucina, leucina, lisina, metionina, valina (López-Rodríguez y col. 2008), cistina y ácido aspártico (Jayakumar y col. 2009). El contenido de proteína en peso seco se ha reportado hasta en un 30 %, el de carbohidratos hasta un 57 % y el contenido de lípidos, principalmente insaturados, es de hasta el 5 % (Breene 1990; Shah y col. 2004). El contenido de humedad en los hongos oscila entre el 80 y 90 % (Stamets y Chilton 1983; Cortés y col. 2007). Esa proteína contenida en los hongos es digestible de un 70 a 80 % (Sánchez y Mata 2012). En la tabla 3 se muestra la composición química proximal del hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783.

*Pleurotus ostreatus*, también, constituye una fuente rica de vitaminas y minerales. En cuanto a las primeras, tenemos la vitamina D, ácido ascórbico (C), tocoferol (E), tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), ácido fólico (B9), cobalamina (B12) y provitaminas como ergosterol y carotenos (Cardona 2001; Jeena y col. 2014). En lo que respecta a los minerales, se identifican el fósforo, sodio,

magnesio, calcio, hierro, manganeso, zinc y cobre (Sales-Campos y col. 2009). Cabe destacar que la composición química de los hongos dependerá de la edad y la especie. Esta variabilidad se ocasiona por las diferencias en el contenido de humedad, temperatura y la presencia de nutrientes en el sustrato sobre el que se desarrollan (Cardona 2001).

**Tabla 3.** Composición química proximal de la harina integral de *P. ostreatus* ATCC 32783

<b>Componente</b>	<b>Base húmeda g en 100g</b>	<b>Base seca g en 100g</b>
Humedad	2.62	0
Proteína cruda	32.43	33.30 ± 0.51
Extracto etéreo	4.38	4.5 ± 0.36
Cenizas	6.36	6.53 ± 0.11
Extracto libre de nitrógeno	42.63	43.78 ± 1.19
Fibra cruda	11.58	11.89*

\*Obtenido por diferencia con el resto de los componentes (Gutiérrez-Hernández 2016)

#### **1.6.4 Propiedades medicinales de *Pleurotus ostreatus***

La especie *Pleurotus ostreatus* se encuentra en la lista de las 37 especies de hongos que se utilizan en la medicina tradicional de Mesoamérica y México (Guzmán 1994). En general, los hongos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes con actividad antioxidante, antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimáticos, reguladores de crecimiento, entre otras características (Suárez y Nieto 2013; Díaz-Godínez 2016).

Específicamente, a *Pleurotus ostreatus* se le atribuyen efectos médicos benéficos como las actividades anticáncer, inmunomoduladores, antivirales, antibióticos anti-inflamatorios, hipocolesterolemico, antitumoral, antitrombótico y actividad antioxidante (Sarangi y col. 2006; Gregori y col. 2007). Los efectos médicos atribuidos a los hongos se debe principalmente a compuestos funcionales, por ejemplo la quitina (polímero estructural de la célula) y los beta glucanos (homo y hetero-glucanos con enlaces glucosídicos) se consideran responsables de ciertas propiedades medicinales. Los beta glucanos están presentes en la fracción de fibra dietética de los hongos, en particular, en la fracción insoluble (Ciappini y col. 2004).

Las moléculas bioactivas presentes en los hongos incluyen a los polisacáridos, proteoglicanos y polifenoles. Los compuestos polifenólicos —también presentes en los hongos— se consideran excelentes antioxidantes, debido a la capacidad de recolección de radicales libres (de Brujin y col. 2008). Los polifenoles encontrados en los hongos dependen de diferentes factores, por ejemplo técnicas de cultivo, sustrato donde se desarrollan, condiciones climáticas extremas, de crecimiento, edad, procesamiento y contaminación. Estas condiciones hacen que los hongos presentes en diversas regiones varíen en su composición y se altere su metabolismo, esto genera una amplia diversidad de compuestos químicos (Zuluaga Vega y col. 2007; Barros y col. 2009).

## **2. ANTECEDENTES**

Diferentes investigaciones han mostrado la actividad antioxidante, conferida por metabolitos secundarios, del micelio (obtenido por fermentaciones líquidas) de distintas especies de hongos. Reyes y col. (2008) cultivaron en un medio de cultivo líquido los hongos *Beltraniella japonica*, *B. portoricensis*, *Beltraniopsis sp.*, *Gliomastix murorum* y MR45 para evaluar la actividad antioxidante del micelio y los extractos fúngicos filtrados, además, realizaron un análisis por cromatografía de gases–espectrometría de masas (CG–EM). Utilizaron los medios de cultivo Czapeck-Dox enriquecido con extracto de levadura (CDL) y caldo de papa dextrosa (CPD) para el crecimiento del hongo. La fermentación se mantuvo a 25 °C con fotoperiodo de luz/oscuridad de 12/12 horas, con una velocidad de agitación de 150 rpm, durante 20 días. A los EFF y extractos elaborados con micelio liofilizado y acetato de etilo se les evaluó la actividad reductora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y actividad antimicrobiana. Los resultados mostraron una alta capacidad antioxidante en los EFF de *B. japonica*, *G. murorum* y MR45, en los medios CPD y CDL. Los extractos realizados con micelio no presentaron actividad antioxidante. Finalmente, el perfil biológico y la cromatografía de gases–espectrometría de masas (CG–EM) de los extractos activos confirmaron la versatilidad metabólica de los hongos, a ser susceptibles de manipulación para la producción de metabolitos útiles en farmacia y agricultura.

Asimismo, se han realizado investigaciones en las que reportan además de la actividad antioxidante, el contenido de polifenoles y flavonoides totales de hongos

comestibles crecidos en fermentación en medio líquido. Barros y col. (2008) reportaron la evaluación antioxidante del micelio de *Leucopaxillus giganteus* (hongo comestible), obtenido de fermentaciones en medio líquido, con diferentes fuentes de carbono: glucosa, sacarosa, fructosa y manitol. De extractos metanólicos de micelio evaluaron polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante (por actividad reductora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), poder reductor y el sistema modelo del linoleato de  $\beta$ -caroteno). (Este hongo se distingue porque ha sido empleado por la industria química para la extracción de antibióticos). Los resultados mostraron que, durante el tiempo de fermentación (60 días), la concentración de compuestos antioxidantes aumentó como una respuesta al estrés oxidativo y a la producción de radicales libres. Asimismo, la mejor fermentación en medio líquido fue la realizada con glucosa, como fuente de carbono. Esta fermentación presentó mayor contenido de polifenoles ( $1.9 \pm 0.55$  mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto), flavonoides ( $12.7 \pm 1.09$  mg equivalentes de catequina por gramo de extracto) y valores bajos de  $EC_{50}$  de la prueba de DPPH ( $3.2 \pm 0.155$  mg/mL de extracto),  $\beta$ -caroteno ( $0.7 \pm 0.126$  mg /mL de extracto) y, finalmente, poder reductor (absorbancia de  $0.8 \pm 0.133$ ). El valor de  $EC_{50}$  representa la concentración de la muestra requerida para neutralizar el 50 % de los radicales libres.

Arboleda y Mejía (2010) realizaron otra investigación en la que decidieron evaluar la influencia del pH e inductores en el medio de cultivo: cobre y aserrín de guadua (*Angustifolia kunth*) para la producción de enzima lacasa y la actividad antioxidante. Ellos trabajaron con el micelio del hongo *Ganoderma* sp. El micelio se obtuvo de una fermentación en medio líquido (150 rpm, 30 °C, por 30 días). Realizaron extractos metanólicos de micelio seco. A los extractos se les evaluó polifenoles totales y actividad reductora de los radicales DPPH y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico). Resultados para la actividad antioxidante, el mayor porcentaje de inhibición del radical ABTS (86 %) se observó a pH 4, sin adición de cobre y con un porcentaje de aserrín de 1.50; y el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH (57 %) se observó a pH 6, sin adición de cobre ni aserrín de guadua.

Por su parte, Vamanu y col. (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana y antioxidante del micelio de dos cepas de *Pleurotus* (EVFB1 y EVFB4). El micelio se obtuvo de fermentaciones en medio líquido (150 rpm, por 10 días). La fuente de carbono

utilizada para la cepa EVFB1 fue glucosa al 10 % y para EVFB4 fue lactosa al 15 %. La biomasa se liofilizó y, posteriormente, se realizaron extractos con etanol y metanol. A los extractos se les realizaron pruebas de polifenoles totales, actividad reductora del radical DPPH y poder reductor. Los resultados mostraron que los extractos etanólicos de ambas cepas obtuvieron un 10 % más de actividad antioxidante en comparación con los extractos metanólicos. La cantidad de polifenoles obtenidos fue diferente, sin importar el solvente usado. Sin embargo, la cepa EVFB1 fue 29 % más eficiente, con un máximo de 68.6 mg EAG/g. Para el caso del poder reductor, los extractos etanólicos de ambas cepas fueron los más eficientes (absorbancia de 2 y 2.2). La conclusión que obtuvieron fue que los extractos etanólicos de ambas cepas presentan la mayor cantidad de compuestos antioxidantes. Así el uso de dichos extractos podrían tener un efecto benéfico en contra de los radicales libres.

Otra investigación realizada para evaluar actividad antioxidante de micelio (obtenido por fermentación líquida), pero además del cuerpo fructífero de un mismo hongo la realizó Jeena y col. (2014). Ellos investigaron el potencial antioxidante, polifenoles y flavonoides de extractos metanólicos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P Kumm y *Pleurotus sapidus* (Schulzer y Kalchbr.) Sacc. El micelio se obtuvo de una fermentación en medio líquido (120 rpm, 25 °C de 10 a 12 días) y los cuerpos fructíferos se cosecharon en su etapa madura. Los resultados mostraron mayor actividad antioxidante (*P. sajor-caju* 88.9 % a 10 mg/mL) y poder reductor (1.98 a 10 mg/mL) en los cuerpos fructíferos. Mientras que el micelio presentó mayor actividad quelante a 10 mg/mL (*P. sapidus* 99 %). *Pleurotus sajor-caju* obtuvo mayor potencial antioxidante en comparación con las otras dos especies. Asimismo, este último presentó mayor contenido de polifenoles y flavonoides 1.53 mg EAG/g y 1.88 mg equivalentes catequina/g, respectivamente. Concluyen que las especies de *Pleurotus* podrían ser usadas como fuente natural de antioxidantes para suplementos alimenticios.

Las distintas investigaciones que se han presentado, hasta este punto, solo muestran evaluación de la actividad antioxidante de micelio obtenido por fermentaciones en medio líquido. A continuación, se muestra más información del contenido de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante de extractos (elaborados con disolventes con diferente polaridad) de cuerpos fructíferos de diversos géneros y especies de hongos.

Jeng-Leun y col. (2002) evaluaron las propiedades antioxidantes y polifenoles totales de extractos metanólicos de hongos comerciales, disponibles en Taiwan, llamados *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma lucidum antler*, *Ganoderma tsugae* y *Coriolus versicolor*. En los resultados se muestra una excelente actividad antioxidante a 6 mg/mL para *G. lucidum*, *G. lucidum antler* y *G. tsugae*, 2.30-6.41 % de peroxidación lipídica. A 4 mg/mL se obtuvo mayor poder reductor por parte del hongo *G. tsugae* (2.38), seguido de *G. lucidum antler* (2.28), *G. lucidum* (1.62) y *C. versicolor* (0.79). A 0.64 mg/mL, el efecto neutralizador del radical DPPH fue de 67.6-74.4 % para *Ganoderma* y 24.6 % para *C. versicolor*. Para la prueba neutralizadora del radical peroxi, *G. lucidum* y *G. lucidum antler* a 16 mg/mL presentaron 51.2 y 52.6 % de inhibición. En la prueba de efecto quelante del ión metálico, a concentración de 2.4 mg/mL, el hongo *G. lucidum antler* fue el mejor con 67.7 %, seguido de *G. lucidum* (55.5 %), *G. tsugae* (44.8 %), y *C. versicolor* (13.2 %). En el caso del contenido de polifenoles totales fue mayor en *G. lucidum antler* y *G. tsugae*, con  $55.96 \pm 0.58$  y  $51.28 \pm 0.51$  mg EAG/g de muestra. Estos dos últimos hongos presentaron los mejores resultados de su investigación.

En el norte de México (estado de Chihuahua) se analizaron los fenoles totales y la capacidad antioxidante de tres hongos silvestres (*Agaricus* sp., *Boletus* sp. y *Macrolepiota* sp.) y dos comerciales (*Agaricus bisporus* cepa blanca y *Portabella*: *Agaricus bisporus* cepa café). La concentración de fenoles totales y actividad antioxidante (poder antioxidante reductor de hierro, FRAP) se determinaron a partir de extractos con metanol al 80 %. Los hongos silvestres presentaron valores más altos en fenoles totales y actividad antioxidante, frente a hongos comerciales. Las características de los hongos silvestres hacen que puedan ser considerados como complemento de la dieta, ya que puedan presentar beneficios para la salud (Alvarez-Parrilla y col. 2007).

Barros y col. (2007) evaluaron la actividad antioxidante de extractos metanólicos de tres especies de hongos silvestres comestibles portugueses: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* y *Agaricus arvensis*. A los extractos se les realizó la prueba reductora del radical DPPH, poder reductor, inhibición de la hemólisis de los eritrocitos y actividad antioxidante mediante el sistema de modelo de linoleato de  $\beta$ -caroteno y polifenoles totales. Los resultados mostraron otros antioxidantes en los tres hongos portugueses y las cantidades se encontraron en bajas cantidades, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y licopeno. Por



otra parte, el mayor componente antioxidante de los extractos de *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* y *Agaricus arvensis* fueron los fenoles totales, con  $6.29 \pm 0.20$ ,  $3.76 \pm 0.11$  y  $2.83 \pm 0.09$  mg de EAG/g de extracto, respectivamente. *Leucopaxillus giganteus* presentó el mayor contenido de polifenoles y el menor valor de  $EC_{50}$  en todas las pruebas realizadas (DPPH 1.44 mg/mL de extracto, poder reductor 1.71 mg/mL, inhibición de la hemólisis de los eritrocitos 1.80 mg/mL y actividad antioxidante mediante el sistema de modelo de linoleato de  $\beta$ -caroteno 2 mg/mL).

Pornariya y Kanok-Orn (2009) evaluaron los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor-caju*, obtenidos de una granja local de Tailandia. Los extractos acuosos y etanólicos al 95 % se obtuvieron con hongos secos. A los extractos se les determinó polifenoles totales, actividad reductora del radical DPPH y FRAP. Los resultados de los extractos acuosos presentaron un alto contenido de polifenoles totales y alta actividad antioxidante en ambos hongos. Para los polifenoles totales en extractos acuosos y etanólicos, se obtuvo  $42.47 \pm 2.27$  y  $30.93 \pm 1.92$  mg EAG/g de muestra seca, respectivamente, en *Pleurotus ostreatus*. Para *Pleurotus sajor-caju* se obtuvo  $39.98 \pm 1.88$  y  $29.30 \pm 1.60$  mg EAG/g de muestra seca, respectivamente. En las pruebas de DPPH y FRAP, *Pleurotus ostreatus* presentó mayor inhibición del radical con 83 %, del extracto acuoso y mayor poder antioxidante reductor de hierro con  $4.38 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{L}$ , ambos a 20 mg/mL de extracto, respectivamente.

En el caso de Hip y col. (2009) reportaron el rendimiento de sustancias fenólicas extraídas de solventes con diferente polaridad (metanol, etanol, acetona, agua y hexano). Utilizaron cuatro especies de hongos (*Pleurotus* sp., *Hygrocybe conica*, *Schizophyllum commune* y *Lentinus ciliatus*) y uno cultivado (*Pleurotus ostreatus*). Los extractos se realizaron con los hongos secos a diferentes tiempos (60, 150, 240 330 y 420 min) y temperaturas (25, 30, 40, 50, y 60 °C). A los extractos se les evaluó polifenoles, flavonoides y taninos condensados. Los resultados mostraron que el extracto acuoso fue el mejor para la extracción de compuestos fenólicos. Asimismo, el extracto acuoso de *Pleurotus* sp. mostró la mayor cuantificación de polifenoles totales, seguido de flavonoides y taninos condensados  $901.75 \pm 2.27$  mg EAG/100g,  $184.80 \pm 1.47$  y  $224.75 \pm 6.47$  mg equivalentes catequina/100g, respectivamente.

Hung y Nhi (2012) evaluaron polifenoles totales libres y ligados, actividad antioxidante y valor nutricional de cinco hongos de Vietnam (*Pleurotus ostreatus*, *Volvariella volvacea*, *Lentinula edodes*, *Auricularia polytricha* y *Ganoderma lucidum*). Los extractos se realizaron con etanol al 80 % e hidrólisis alcalina. En los resultados, los hongos *V. volvacea* y *G. lucidum* presentaron el mayor contenido de polifenoles totales libres y ligados con 4122.7 y 670.9 µg EAG/g de muestra seca, respectivamente. Estos mismos hongos obtuvieron el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH con 82.9 y 7.5 %, respectivamente. Por último, los hongos *V. volvacea* y *L. edodes* se consideraron un fuente de proteína, presentaron un rango de 26.3- 36.5 %, en peso fresco.

En el año 2013, Gan y col. analizaron polifenoles totales, flavonoides y la actividad antioxidante de *Agaricus bisporus* blanco (obtenido de un centro comercial de Selangor, Malasia) y *Agaricus brasiliensis* (obtenido de un local de medicina china). Para esta investigación realizaron dos tipos de extractos: el primero fue con etanol al 60 % y el segundo con agua. Los resultados mostraron que *Agaricus bisporus* blanco tuvo mayor contenido de polifenoles en el extracto acuoso ( $21.47 \pm 0.48$  mg EAG/g de peso seco) mientras que *Agaricus brasiliensis* tuvo mayor cuantificación de polifenoles en el extracto etanólico ( $12.50 \pm 0.22$  mg EAG/g de seco de extracto). En el contenido de flavonoides totales *Agaricus brasiliensis* tuvo mayor contenido que *Agaricus bisporus* con  $5.36 \pm 0.20$  y  $3.37 \pm 0.17$  mg equivalentes quercetina/g seco de extracto para el extracto etanólico y acuoso, respectivamente. En la actividad antioxidante por el método del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP), *Agaricus brasiliensis* presentó mayor actividad antioxidante total que *Agaricus bisporus* en el extracto etanólico y de forma opuesta en el extracto acuoso ( $107.24 \pm 2.19$  y  $186.72 \pm 2.84$  µmol equivalentes  $\text{Fe}^{2+}$ /g de peso seco de extracto). En la prueba reductora del radical DPPH, *Agaricus brasiliensis* presentó valores de  $\text{EC}_{50}$  menores,  $1.67 \pm 0.21$  y  $3.80 \pm 0.72$  mg/mL para el extracto etanólico y acuoso, respectivamente. Finalmente, la actividad antioxidante presentada en el extracto etanólico se debió a la presencia de polifenoles.

En el mismo año (2013), Menaga y col. reportaron la actividad antioxidante de un extracto metanólico de *Pleurotus florida*. El extracto fue hecho con el aparato de Soxhlet. Evaluaron actividad reductora del radical DPPH, poder reductor, radical superóxido, radical hidroxilo y actividad queladora de metales. A concentración de 100 µg/mL, el resultado

para la prueba de DPPH fue de 78 % de inhibición del radical. El valor de IC<sub>50</sub> para la misma prueba fue de 50 µg/mL. El extracto manifestó significativo poder reductor con 0.911 de absorbancia. A una concentración máxima del extracto metanólico de 1000 µg/mL mostró inhibición del óxido nítrico y radical superóxido con 81.8 y 65 %, respectivamente. También, presentó efecto quelante e inhibición del radical peroxi con 64 y 59 %, respectivamente. Concluyeron que el extracto metanólico presentó actividad antioxidante significativa y el hongo podría ser un alimento accesible con antioxidantes naturales.

Otras investigaciones, además de evaluar la actividad antioxidante por algunos métodos, también han reportado compuestos antioxidantes encontrados en los diferentes extractos evaluados. Por ejemplo, Guzmán y col. (2009) evaluaron un extracto etanólico del hongo comestible *Pleurotus djamor*. Al extracto etanólico se le realizó un análisis químico mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Este análisis permitió identificar 13 compuestos esteroideos, los que se reportaron por primera vez en esta especie. Al extracto también le fue evaluada la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS, encontrando valores IC<sub>50</sub> de 115.5 y 29.37 µg/mL de extracto. Los datos obtenidos por estos autores sugieren que *Pleurotus djamor* puede ser usado como una sustancia antioxidante natural.

De igual manera, Zuluaga y col. (2007) evaluaron el extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum* por análisis de cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron 14 compuestos. En los resultados de los extractos, encontraron compuestos no reportados en la bibliografía. Por lo tanto se propusieron como compuestos químicos novedosos. También, evaluaron la actividad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS, encontrando valores de EC<sub>50</sub> de 48.7 ppm y 15.5 ppm en el subextracto de acetato de etilo y 80.7 ppm y 19.2 ppm en el subextracto de diclorometano, respectivamente. Estos extractos se obtuvieron por las diferentes fracciones realizadas del extracto metanólico.

Yee y col. (2008) seleccionaron cinco especies de hongos comestibles (*Pleurotus* sp., *Hygrocybe* sp., *Hygrophorus* sp., *Schizophyllum commune*, y *Polyporus tenuiculust*) para determinar la composición proximal, vitaminas (retinol, α-tocoferol, γ-tocoferol, tiamina, rivo flavina y ácido ascórbico), minerales, actividad antioxidante y fenoles totales. Los extractos se realizaron con dos diferentes disolventes, éter de petróleo y metanol,

manteniéndose en agitación por 24 h a temperatura ambiente. Los resultados mostraron que el hongo *Hygrocybe* sp. presentó el mayor contenido de fenoles totales en el extracto de éter de petróleo y metanólico con 28.23 y 42.21 mg EAG/g de extracto, respectivamente. Para la actividad reductora del radical DPPH, el extracto de éter de petróleo del hongo *Pleurotus* sp. fue el mejor con 83.04 % de inhibición del radical (a 20 mg/mL de extracto). En el efecto quelante del ión metálico, *Hygrophorus* sp. obtuvo el mayor efecto quelante con 67.39 % e *Hygrocybe* sp. con 92 % del extracto de éter de petróleo y metanólico (a 20 mg/mL de extracto), respectivamente. Asimismo, los extractos de hongos no presentaron un alto contenido de  $\alpha$ -tocoferol, tiamina y ácido ascórbico excepto *Pleurotus* sp. Como conclusión, mencionaron que los compuestos encontrados en los extractos de hongos podrían ser usados como una fuente natural de antioxidantes para suplementación de alimentos.

Barros y col. (2008) determinaron la actividad antioxidante de cinco hongos del género *Agaricus* sp. por ensayos químicos, bioquímicos y electroquímicos. Los hongos se liofilizaron y, posteriormente, se realizaron extractos metanólicos (obtenidos a 25 °C a 150 rpm por 24 h). En los ensayos químicos se evaluó poder reductor y actividad reductora de DPPH. Para los ensayos bioquímicos se evaluó la capacidad de inhibición de peroxidación lipídica. Los resultados mostraron que *Agaricus silvaticus* tuvo los valores más bajos de EC<sub>50</sub> para la actividad reductora del radical DPPH, poder reductor, inhibición de blanqueamiento de  $\beta$ -caroteno, inhibición de hemólisis e inhibición de peroxidación lipídica TBARS con  $5.37 \pm 0.06$ ,  $2.08 \pm 0.05$ ,  $3.72 \pm 0.21$ ,  $22.15 \pm 0.31$  y  $17.79 \pm 0.10$  mg/mL de extracto, respectivamente. Asimismo, *Agaricus silvaticus* presentó mayor contenido de polifenoles totales y flavonoides con  $8.95 \pm 0.30$  mg EAG/g de extracto y  $3.88 \pm 0.04$  mg equivalentes catequina/g de extracto, respectivamente. *Agaricus silvaticus*, *Agaricus romagnesii* y *Agaricus silvícola* presentaron la misma cantidad de ácido ascórbico ( $0.04 \pm 0.00$  mg de ácido ascórbico/g de extracto). Por otra parte, *Agaricus arvensis* presentó mayor contenido de  $\beta$ -caroteno y licopeno con  $8.52 \pm 0.38$  y  $4.70 \pm 0.25$   $\mu$ g de carotenoides/g de extracto.

Barros y col. (2009) realizaron un análisis de compuestos fenólicos en 16 hongos comestibles de Portugal (*Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus silvícola*, *Agaricus romagnesii*, *Cantharellus cibarius*, *Hypholoma fasciculare*, *Lactarius deliciosus*,

*Lactarius piperatus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Lepista nuda*, *Lycoperdon molle*, *Lycoperdon perlatum*, *Macrolepiota procera*, *Sarcodon imbricatus*, *Ramaria botrytis*, *Tricholoma acerbum*). El análisis se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detector de matriz de fotodiodos y espectrómetro de masas (HPLC-DAD-ESI/MS). Estos autores no encontraron flavonoides pero sí diversos ácidos fenólicos llamados protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico y dos isómeros del ácido vanílico (tabla 4). También, evaluaron la cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante, por el método de reducción del radical DPPH, en donde se obtuvieron rangos de 1.75-20.32 mg EAG/g de extracto y EC<sub>50</sub> = 0.66-20.24 mg/ml de extracto, respectivamente.

**Tabla 4.** Ácidos fenólicos de hongos comestibles

Compuesto	Hongo	Referencia
Ácido protocatecuico	<i>Lepista nuda</i> <i>Ramaria botrytis</i>	Barros y col. (2009)
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	<i>Agaricus arvensis</i> <i>Agaricus bisporus</i> <i>Agaricus silvícola</i> <i>Agaricus romagnesii</i> <i>Lactarius deliciosus</i> <i>Lepista nuda</i> <i>Lycoperdon molle</i> <i>Sarcodon imbricatus</i> <i>Ramaria botrytis</i> <i>Tricholoma acerbum</i>	
Isómeros del ácido vanílico	<i>Lycoperdon molle</i> (TR:40.5 y 44.1 min) <i>Tricholoma acerbum</i> (TR: 40.5 y 44.1 min)	
Ácido <i>p</i> -cumárico	<i>Agaricus arvensis</i> <i>Agaricus silvícola</i> <i>Lepista nuda</i>	

Otra investigación fue realizada por Shirmila y Radhamany (2012) en la que trabajaron con el hongo bioluminiscente *Omphalotus nidiformis* con el fin de promover la sustentabilidad del mismo. Evaluaron polifenoles totales, flavonoides totales, actividad reductora del radical DPPH, cromatografía de capa fina para componentes antioxidantes y

ensayo de Dot-blot de un extracto metanólico (elaborado en el aparato de Soxhlet). El análisis fitoquímico preliminar mostró la presencia de compuestos activos: fenoles, flavonoides, alcaloides, terpenoides y saponinas. El contenido de polifenoles totales fue de  $1.901 \pm 0.011$  mg EAG/g de extracto. El contenido total de flavonoides se estimó en 0.29 mg de equivalentes quercetina/g de extracto seco. El ensayo de Dot-blot y la cromatografía indicaron la presencia de compuestos antioxidantes. La actividad reductora del radical DPPH presentó un  $IC_{50} = 450$   $\mu$ g/mL de extracto. Concluyeron que el hongo *Omphalotus nidiformis* contiene metabolitos secundarios con alta actividad antioxidante.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, el estudio de los componentes bioactivos de los hongos comestibles se ha incrementado a nivel mundial. Se han realizado muchos esfuerzos para extraer, identificar y evaluar los efectos de compuestos bioactivos de hongos, *in vivo* o *in vitro*. Por esta razón, la búsqueda y caracterización de compuestos bioactivos con actividad antioxidante de otras especies de hongos es trascendental. Por ello, el uso potencial del hongo *Pleurotus ostreatus* (ATCC 32783) sería una opción valiosa, en la investigación científica de la biotecnología, para la producción de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante.

Estas propiedades que se buscan en *Pleurotus ostreatus* resultarían útiles, particularmente para reconocerlo como nueva fuente de antioxidantes naturales. Por lo anterior, esta investigación consistió en evaluar los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante del hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 en sus distintas fases de crecimiento (micelio, primordio y cuerpo fructífero) y aportar conocimiento relevante.

### **4. HIPÓTESIS**

El nivel de actividad antioxidante que presente el hongo *Pleurotus ostreatus*, en fresco y deshidratado, dependerá de la etapa de crecimiento en la que se encuentre el hongo así como el tipo de solvente y temperatura utilizados.

## **5. OBJETIVOS**

Evaluar la actividad antioxidante del hongo *Pleurotus ostreatus* en sus distintas fases de crecimiento desarrollado en paja de trigo

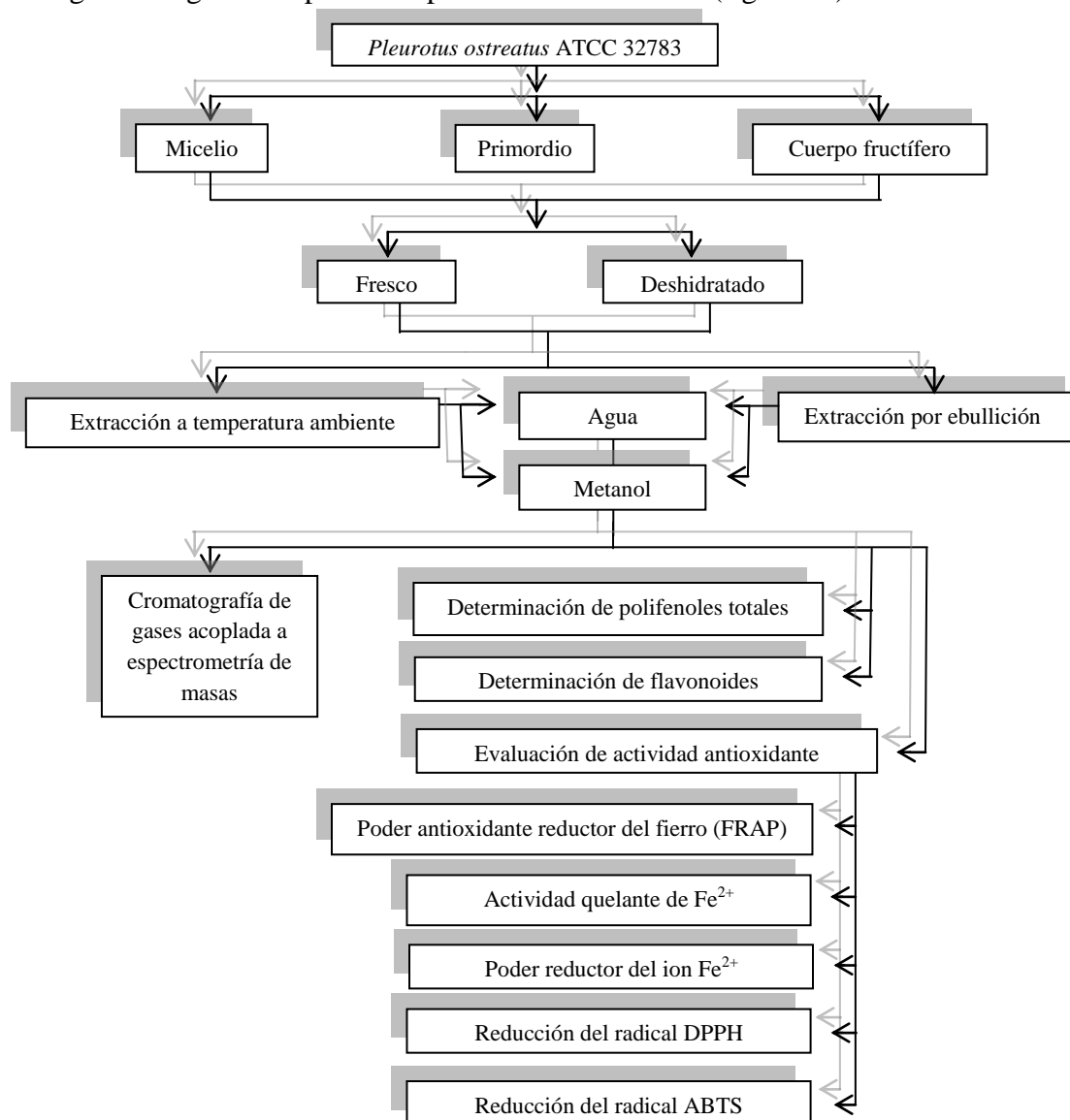
### **5.1 Objetivos particulares**

1. Realizar extractos con disolventes y el hongo *Pleurotus ostreatus* en sus distintas fases de crecimiento.
2. Evaluar polifenoles totales y flavonoides de los extractos del hongo *Pleurotus ostreatus* en sus distintas fases de crecimiento.
3. Evaluar la actividad antioxidante, por distintos métodos, de los extractos del hongo *Pleurotus ostreatus* en sus distintas fases de crecimiento.
4. Realizar una caracterización de compuestos fenólicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los mejores extractos.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación el organismo de estudio fue el hongo *Pleurotus ostreatus* en sus distintas fases de crecimiento (micelio, primordio y cuerpo fructífero). Las fases de crecimiento fueron utilizadas en deshidratado y fresco para la elaboración de extractos, a temperatura ambiente y ebullición, con solventes de diferente polaridad. A los extractos obtenidos se les determinaron polifenoles y flavonoides totales así como la evaluación de la actividad antioxidante. Finalmente, a los mejores extractos se les realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (figura 13).



**Figura 13.** Estrategia experimental para la determinación de polifenoles y flavonoides totales y la evaluación de la actividad antioxidante del hongo *Pleurotus ostreatus*

## **6.1 Organismo de estudio**

En esta investigación se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 (American Type Culture Collection, Manassas, EUA). El inóculo de *Pleurotus ostreatus* se desarrolló en cajas Petri sobre agar extracto de malta, a una temperatura de 28 °C durante siete días, almacenándose a 4 °C y resemebrándose cada mes (para mantener la cepa activa).

## **6.2 Condiciones de cultivo**

Una vez invadida la caja Petri por el crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus*, 10 pellets de micelio (tomados de la periferia de la colonia) de 4 mm de diámetro se inocularon en granos de trigo (500 g), previamente hidratado y esterilizado. Posteriormente, el trigo ya inoculado se incubó a 28 °C, para la obtención de la semilla.

Al obtener la semilla, esta fue inoculada en paja de trigo, previamente pasteurizada (5 kg a 70 % de humedad) en una bolsa de plástico e incubada en un cuarto oscuro a una temperatura de 25 °C por 15 días, aproximadamente. Enseguida, la bolsa de paja invadida por el micelio fue expuesta a luz/oscuridad a 21 °C por 8 días. Durante este proceso, se obtuvo el hongo en sus diferentes fases de crecimiento, el micelio (crecido en la paja de trigo), los primordios y cuerpos fructíferos.

## **6.3 Obtención de los extractos**

Para la realización de los extractos se utilizó el hongo *Pleurotus ostreatus* en sus distintas etapas de crecimiento de dos maneras, en fresco y deshidratado. El hongo en sus distintas etapas de crecimiento obtenido en fresco se maceró, con un mortero, y se procedió a la elaboración del extracto. En el caso del hongo en sus distintas etapas de crecimiento deshidratado, éste llevó un proceso de deshidratación en un horno a 58 °C por 24 h. Posteriormente, se realizó una molienda y finalmente un tamizado, con una abertura de malla de 420 micrones (malla No. 40, MONTINOX 10165). La harina obtenida del hongo en sus distintas fases de crecimiento se almacenó a 4 °C hasta su utilización. Aunque en esta investigación se utilizó el hongo en fresco y deshidratado, los resultados se reportaron en base seca considerándose el 90 % de humedad del hongo fresco.

Todos los extractos se realizaron con la metodología propuesta por Miliauskas y col. (2004), con 0.5 g de muestra y 10 mL de disolvente. Los extractos se realizaron con diferentes temperaturas, a temperatura ambiente (TA) y por ebullición (E). Los extractos

obtenidos a temperatura ambiente se realizaron con dos disolventes, agua y metanol. En estos extractos, la mezcla (muestra + disolvente) se mantuvo en agitación por 30 minutos.

Los extractos obtenidos por ebullición se realizaron con dos disolventes, agua y metanol. En el caso de la extracción acuosa, se calentó el agua hasta su ebullición y se agregó la muestra; la mezcla se dejó en ebullición por 5 minutos. Para el caso de la extracción con metanol, se llevó a cabo con el equipo Soxhlet (AOAC 2000). El sobrenadante se recuperó por centrifugación para el caso de los extractos acuosos. Para los extractos realizados con metanol, los sobrenadantes se recuperaron con un rotavapor. El residuo obtenido se solubilizó en dimetilsulfóxido al 5 %. Todos los extractos obtenidos se almacenaron a 4 °C para su posterior utilización.

#### **6.4 Determinación de polifenoles totales**

El contenido de polifenoles totales se determinó de acuerdo con el método descrito por Singleton y col. (1999). Brevemente, se mezclaron 500 µL de extracto con 4.5 mL de agua destilada, 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteu, 500 µL de solución saturada de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y 4.3 mL de agua destilada. La mezcla se incubó 1 h en oscuridad a temperatura ambiente y su absorbancia se midió a 765 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico de 25–200 mg/L (apéndice A). El contenido de polifenoles totales se reportó en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra deshidratada (mg EAG/g).

#### **6.5 Determinación de flavonoides**

El contenido de flavonoides se determinó de acuerdo con el método descrito por Chia-Chi y col. (2002). Brevemente, se mezclaron 500 µL de extracto con 1.5 mL de etanol al 95 %, 100 µL de cloruro de aluminio al 10 %, 100 µL de acetato de potasio al 1 M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se incubó por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente y su absorbancia se midió a 415 nm. Se realizó una curva de calibración con quercetina de 0–10 mg/100 mL (apéndice B). El contenido de flavonoides se reportó en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra deshidratada (mg EQ/g).

## 6.6 Poder antioxidante reductor de hierro

La prueba de poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) se determinó de acuerdo con el método realizado por Sudha y col. (2012). El reactivo FRAP se realizó con 2.5 mL de 10 mM de TPTZ (2,4,6 tripiridil-s triazina) en 40 mM de HCl, 2.5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 10 mM y 25 mL de buffer de acetatos a 0.3 M (pH 3.6). El reactivo FRAP se preparó diariamente y se mantuvo a 37 °C. La mezcla de reacción se realizó con 900  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP, 90  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 30  $\mu\text{L}$  de extracto. La mezcla se incubó a 37 °C por 10 min en baño maría. Al final de la incubación se leyó su absorbancia a 593 nm. Se realizó una curva de calibración con sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) de 100-1800  $\mu\text{M}$  (apéndice C). Los datos se reportaron en micromoles de sulfato de hierro por gramo de muestra deshidratada ( $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ ).

## 6.7 Actividad quelante de iones metálicos

La actividad quelante de iones metálicos se realizó de acuerdo con el método descrito previamente por Zhengjun y col. (2008). Se mezclaron 1 mL de extracto con 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2$  al 2 mM/L, 1.85 mL de agua destilada y 100  $\mu\text{L}$  de ferrozina al 5 mM/L. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, se leyó su absorbancia a 562 nm. El efecto quelante se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ efecto quelante} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

$A_{\text{control}}$  = Absorbancia del control negativo.

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la muestra después de 10 min.

La actividad quelante se reportó en valores de  $\text{EC}_{50}$  con unidades de mg EAG/L. Los valores de  $\text{EC}_{50}$  se calcularon a partir del gráfico que representa la concentración de la muestra requerida para un efecto quelante del 50 %. El valor de  $\text{EC}_{50}$  se usa frecuentemente para expresar la cantidad o concentración de extracto necesario para neutralizar el 50 % de radicales libres. El valor de  $\text{EC}_{50}$  es inversamente proporcional a la actividad quelante del extracto (Seow-Mun y col. 2012).

## 6.8 Poder reductor

El poder reductor se realizó de acuerdo con el método descrito por Seow-Mun y col. (2012). Se mezclaron 50 µL de extracto con 200 µL de buffer de fosfatos (0.02 M a pH 6.6), 200 µL de hexacianoferrato de potasio [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] al 1 %. Esta mezcla se agitó y se incubó a baño maría por 20 min a 50 °C. Después, se le agregaron 250 µL de ácido tricloroacético al 10 % y se centrifugó esta nueva mezcla a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Del sobrenadante recuperado de dicha mezcla, se tomaron 500 µL y se agregaron 500 µL de agua desionizada y 100 µL de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 0.1 %. Finalmente, se agitó y se leyó su absorbancia a 700 nm. Los resultados se reportaron por la absorbancia obtenida a las concentraciones de 100 y 500 mg EAG/L para las muestras en deshidratado y frescas, respectivamente. Las diversas concentraciones utilizadas de los extractos se graficaron vs. las absorbancias obtenidas para indicar que son dependientes de la concentración.

## 6.9 Actividad reductora del radical DPPH

La prueba antioxidante con el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) se realizó de acuerdo con Moraes-de-Souza y col. (2008). Se mezclaron 500 µL de extracto, 3 mL de metanol y 300 µL del radical DPPH (este a 0.5 mM preparado con metanol). La mezcla se incubó por 45 min en oscuridad a temperatura ambiente. Al final de la incubación se leyó su absorbancia a 517 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

$A_{\text{control}}$  = Absorbancia del control negativo.

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la muestra después de 45 min.

## 6.10 Actividad reductora del radical ABTS

La prueba antioxidante con el radical ABTS se realizó de acuerdo con Re y col. (1999) con algunas modificaciones. El radical libre ABTS se obtuvo tras la reacción del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) (7mM) con persulfato de potasio (2.45 mM concentración final). Para la formación del radical, se mantuvo de 12 a 16 horas a temperatura ambiente (25 °C) en la oscuridad. Una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup>, este se diluyó en agua hasta obtener una absorbancia comprendida entre 0.700 (± 0.2) a 734 nm.

La mezcla de reacción se realizó con 70 µL de muestra y 3 mL del radical ABTS. Esta mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 6 min y se leyó su absorbancia a 734 nm. La disminución de la coloración se expresó como el porcentaje de inhibición del radical ABTS<sup>+</sup>. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

$A_{\text{control}}$  = Absorbancia del control negativo a tiempo cero.

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la muestra después de 6 min.

La actividad reductora de los radicales DPPH y ABTS se reportó en valores de EC<sub>50</sub> con unidades de mg EAG/L. Los valores de EC<sub>50</sub> se calcularon a partir del gráfico que representa la concentración de la muestra requerida para neutralizar el 50 % de los radicales libres DPPH y ABTS. El valor de EC<sub>50</sub> se usa frecuentemente para expresar la cantidad o concentración del extracto necesario para neutralizar el 50 % de radicales libres.

### **6.11 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Los mejores extractos se analizaron por cromatografía de gases (Agilent Technologies, 7890A GC System), equipado con una columna (Agilent DB-WAX, 30 m x 320 µm x 0.25 µm), acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5975C V2-MSD with Triple-Axis Detector) con muestreo automático e inyector (G4513A). El cromatógrafo se programó a una temperatura de 60 °C por 5 min, posteriormente a 11 °C/min hasta 250 °C. Para el gas de arrastre se utilizó He con 99.9995 % de pureza. El flujo de la columna se mantuvo en 1.2926 mL/min.

### **6.12 Análisis estadístico**

Todos los análisis se corrieron por triplicado y los resultados se promediaron. Los datos se analizaron con el software Sigma Stat. Los valores de la actividad antioxidante de los extractos se evaluaron por ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. Los valores de *P* inferiores a 0.050 se consideraron estadísticamente significativos.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Organismo de estudio

En la realización de esta investigación, se obtuvo el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 en sus distintas etapas de crecimiento. El micelio se obtuvo del día 15 al 18 después de la inoculación en paja de trigo (figura 14). Posteriormente, los primordios (figura 15) y cuerpos fructíferos (figura 16) se recolectaron del día 18 al 20 y del 25-30, respectivamente.



**Figura 14.** Micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*



**Figura 15.** Primordios del hongo *Pleurotus ostreatus*



**Figura 16.** Cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus*

## 7.2 Determinación de polifenoles totales

En general, la determinación de polifenoles de los extractos acuosos y metanólicos, obtenidos a temperatura ambiente y ebullición, del hongo deshidratado mostró que la fase del cuerpo fructífero (CF Po83) presentó mayor contenido de polifenoles, seguido por el primordio (P Po83) y, finalmente, el micelio (M Po83) (figura 17). En el caso de los extractos acuosos, obtenidos a temperatura ambiente de muestras deshidratadas, los mejores extractos fueron el CF Po83 y P Po83 con  $11.36 \pm 0.04$  y  $8.94 \pm 0.03$  mg EAG/g, respectivamente. Los extractos acuosos obtenidos por ebullición mostraron un contenido similar, 4 mg EAG/g, estos extractos no mostraron una diferencia significativa (los resultados se muestran en el apéndice C). Para el caso de los extractos metanólicos de muestras deshidratadas, obtenidos a temperatura ambiente y ebullición, se obtuvieron valores entre  $0.62 \pm 0.01$  y  $2.39 \pm 0.02$  EAG/g. Estos valores no fueron superados por los extractos acuosos, obtenidos a temperatura ambiente y ebullición, de muestras deshidratadas.

Los extractos acuosos obtenidos a temperatura ambiente de muestras en fresco presentaron valores similares de 4-5 mg EAG/g. En los extractos acuosos obtenidos por ebullición, el mejor extracto fue el CF Po83 con  $9.92 \pm 0.05$  mg EAG/g. Asimismo, para los extractos metanólicos de muestras frescas, el mejor extracto fue P Po83 con  $12.06 \pm 0.02$  mg EAG/g, obtenido por ebullición (figura 18). Este último valor supera todos los obtenidos por los extractos acuosos y metanólicos de muestras deshidratadas y frescas. Los valores de los resultados obtenidos de la determinación de polifenoles totales se muestran en los apéndices C y D.

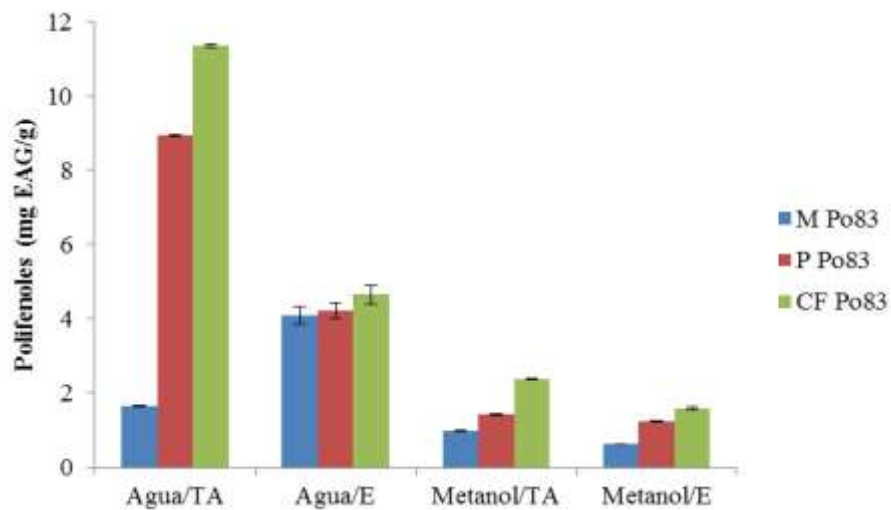
Song y Leo (2008) reportaron polifenoles totales de extractos acuosos obtenidos con agua caliente y el hongo *Ganoderma lucidum* y *A. brasiliensis*, recolectados de distintas localidades. Para el hongo *Ganoderma lucidum* reportaron un rango de 0.128 a 2.78 mg EAG/mL y para *A. brasiliensis* 0.512 y 0.0853 mg EAG/mL. Los valores reportados fueron bajos en comparación con los obtenidos en esta investigación, con el mismo tratamiento y reportado en las mismas unidades. Yim y col. (2009) reportaron valores de polifenoles totales de extractos acuosos de los hongos *Pleurotus* sp. y *Pleurotus ostreatus*, con 9.01 y 7.23 mg EAG/g, respectivamente. Ambos valores fueron bajos con los reportados en esta investigación, por el extracto acuoso del cuerpo fructífero fresco obtenido por ebullición



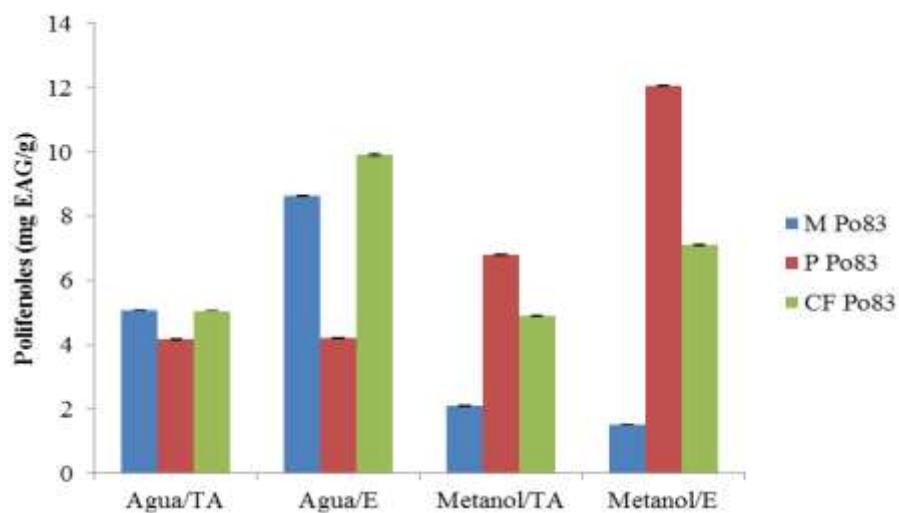
( $9.92 \pm 0.05$  mg EAG/g) y el extracto acuoso del cuerpo fructífero obtenido a temperatura ambiente ( $11.36$  mg EAG/g). También, los valores reportados en los extractos metanólicos de *Pleurotus* sp. ( $5.06$  mg EAG/g) y *Pleurotus ostreatus* ( $6.03$  mg EAG/g) fueron menores con los valores reportados en esta investigación de extractos metanólicos de P Po83 y CF Po83, ambos obtenidos por ebullición,  $12.06 \pm 0.02$  y  $7.1 \pm 0.02$ , respectivamente.

Por su parte, Nuran y col. (2012) reportaron  $32.21$  mg EAG/g de un extracto metanólico de *Pleurotus eryngii*. Este valor fue superior a los valores reportados en los extractos metanólicos de esta investigación. En otro estudio realizado en 2013 por Beltrán y col. se reportó el contenido de polifenoles totales de un extracto acuoso del hongo *Pleurotus ostreatus* comercial con  $7.98$  mg EAG/g de muestra deshidratada. Este valor es menor comparado con el extracto acuoso obtenido a temperatura ambiente obtenido en esta investigación, con  $11.36 \pm 0.04$  mg EAG/g.

Zuluaga y col. (2007) sugieren que la diferencia reportada de los valores obtenidos del contenido de polifenoles totales en las diferentes especies de hongos es debido a su biogénesis. La razón que mencionan es porque está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes propios del sustrato donde se desarrollan y de las condiciones climáticas que los rodean, haciendo que se altere su metabolismo, generando una amplia diversidad de compuestos químicos. Los resultados se han reportado en equivalentes de un compuesto estándar en particular (por ejemplo catequina, ácido gálico), asimismo, con unidades diferentes y estos aspectos hacen de los resultados obtenidos por diferentes autores difíciles de comparar.



**Figura 17.** Polifenoles totales de hongos deshidratados



**Figura 18.** Polifenoles totales de hongos frescos

M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

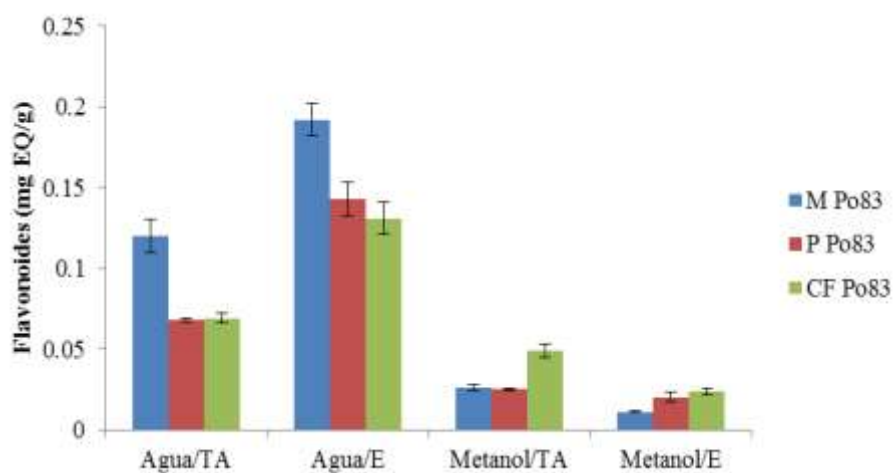
CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición

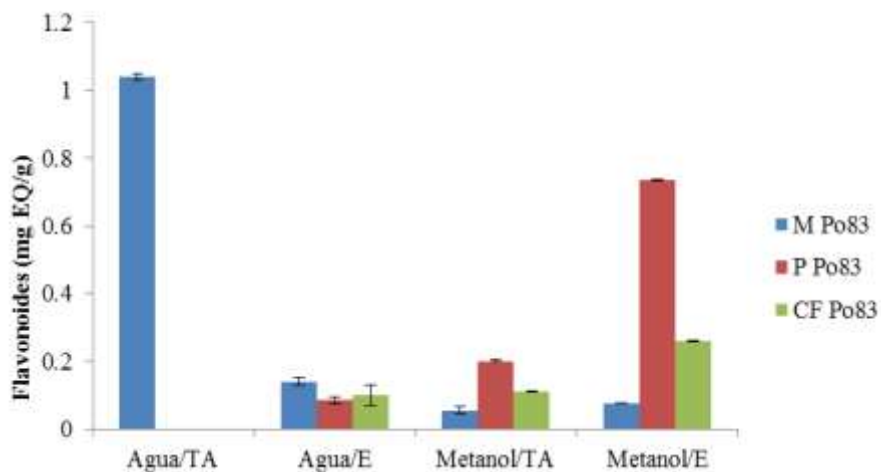
### 7.3 Determinación de flavonoides

La determinación de flavonoides de todos los extractos de esta investigación fue reportada con valores bajos. Los valores obtenidos estuvieron dentro del rango de  $0.011 \pm 0.001$  a  $1.04 \pm 0.008$  mg EQ/g (figuras 19 y 20). Específicamente, el extracto acuoso, obtenido a temperatura ambiente, del CF Po83 y P Po83 frescos reportaron cero (figura 20). El contenido más alto en flavonoides corresponde al extracto de M Po83 fresco obtenido a temperatura ambiente. El contenido de flavonoides representó un pequeño porcentaje del contenido total de polifenoles reportados en esta investigación. Estos valores comparados con los obtenidos por otros autores reportaron lo siguiente: Arbaayah y Umi (2013) reportaron un alto contenido de flavonoides de un extracto metanólico de varias especies de *Pleurotus*. Los valores que presentaron se encontraron dentro del rango 1.40-29.80 mg EQ/g, estos valores superan completamente los obtenidos en esta investigación. Jan-Ying y col. (2011) reportaron flavonoides de extractos etanólicos, en agua fría y caliente de dos cepas de *Grifola frondosa*, con 0.11 y 3.05; 1.19 y 0.76; 1.09 y 0.52 mg EQ/g de muestra seca, respectivamente. En general, los valores obtenidos por Jan-Ying y col. se encuentran dentro del rango obtenido en esta investigación con excepción del extracto etanólico con valor de 3.05 mg EQ/g, este último supera a los valores obtenidos en esta investigación. Sudha y col. (2012) reportaron el contenido de flavonoides de un extracto en acetato de etilo, metanol y agua de *Pleurotus eous*. Los valores obtenidos se reportaron de 6.38 a 7.79 mg catequina/g de extracto. Por su parte, Gil-Ramírez y col. (2016) realizaron una extensa investigación en la que, primero encontraron cerca de 136 trabajos de investigación en los que se menciona la presencia de flavonoides en hongos (de diferentes especies). Segundo, después de un trabajo de investigación realizado por ellos, reportaron que los hongos no contienen flavonoides. Ellos sugieren que los flavonoides pueden ser encontrados en las hifas del hongo debido a la facilidad de absorber nutrientes y compuestos encontrados en el sustrato donde los hongos crecen o bien se encuentren cercanos a una planta en la que se forme una micorriza. Algunas plantas secretan flavonoides para regular la simbiosis entre planta-microbio, con esto define la tolerancia de las especies al crecimiento en sus raíces. Los flavonoides son compuestos antifúngicos, porque las plantas las producen para su protección contra infecciones fúngicas. Además, existe la posibilidad de que los flavonoides afecten negativamente el crecimiento del hongo. Asimismo, Barros y col.

(2009) coinciden con Gil-Ramírez y col. (2016) al no encontrar flavonoides en 16 hongos portugueses, después de un análisis en cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detector de matriz de fotodiodos y espectrómetro de masas (HPLC-DAD-ESI/MS). Ellos sugieren que al no encontrar flavonoides en hongos no se debería considerar un resultado sorprendente, debido a que solo las plantas poseen la habilidad de producir flavonoides y no los animales ni los hongos. Los valores de los resultados obtenidos de flavonoides totales se muestran en los apéndices E y F.



**Figura 19.** Flavonoides de hongos deshidratados



**Figura 20.** Flavonoides de hongos frescos

M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

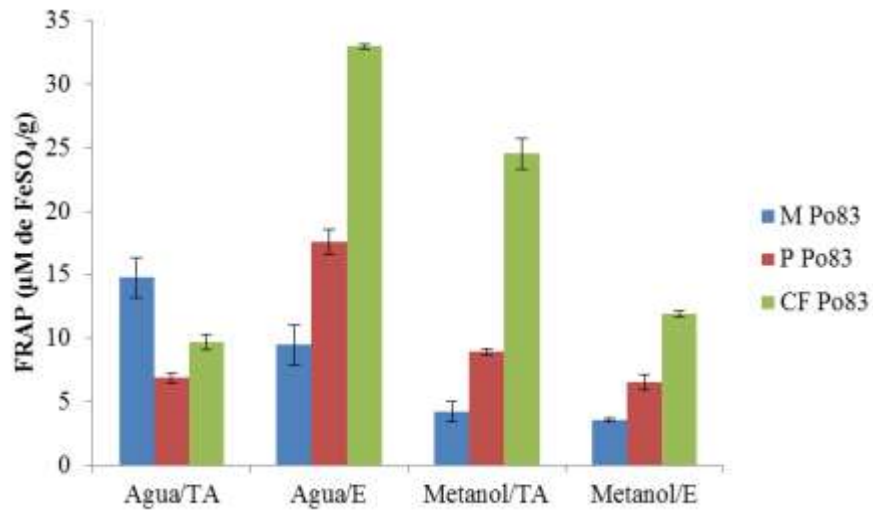
TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición

#### 7.4 Poder antioxidante reductor de hierro

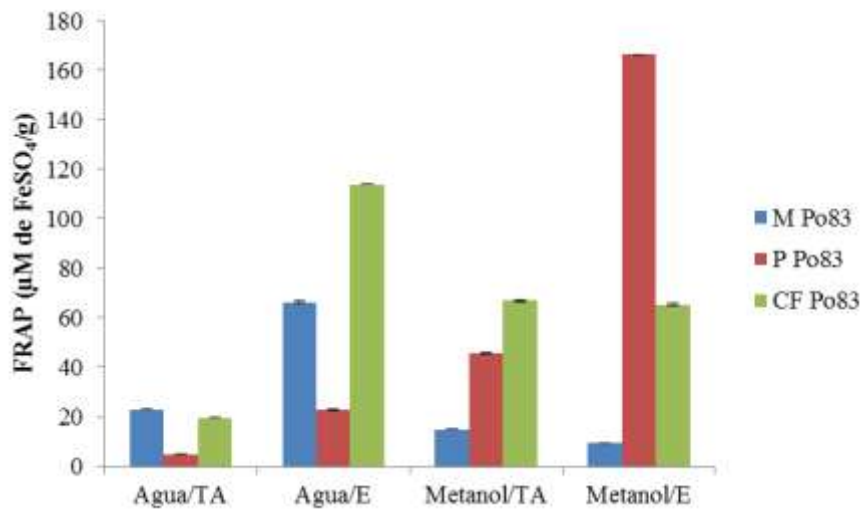
La actividad antioxidante medida por el método de FRAP se observó en todos los extractos acuosos y metanólicos (figura 21 y 22). En general, los valores de la actividad antioxidante de los extractos elaborados con el hongo en sus distintas fases de crecimiento en fresco presentaron valores más altos en comparación con los deshidratados. En los extractos elaborados con el hongo en sus distintas fases de crecimiento deshidratadas, el mejor extracto fue el acuoso del CF Po83 (obtenido por ebullición), con  $33 \pm 0.20 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ , seguido del metanólico del CF Po83 (obtenido a temperatura ambiente), con  $24.53 \pm 1.2 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ . El resto de los extractos acuosos y metanólicos del hongo deshidratado, obtenidos a temperatura ambiente y ebullición, presentaron un rango entre  $3.56 \pm 0.13$  y  $17.60 \pm 1 \mu\text{M de FeSO}_4/\text{g}$ .

Para los valores de actividad antioxidante presentada por los extractos elaborados con el hongo en sus distintas fases de crecimiento en fresco, con valores obtenidos de  $166.5 \pm 0.10$  y  $113.9 \pm 0.24 \mu\text{M de FeSO}_4/\text{g}$ , el extracto metanólico de P Po83 y el acuoso del CF Po83, ambos obtenidos por ebullición, fueron los mejores extractos para esta prueba. El resto de los extractos acuosos y metanólicos del hongo fresco, obtenidos a temperatura ambiente y ebullición, presentaron un rango entre  $4.87 \pm 0.05$  y  $66.90 \pm 0.34 \mu\text{M de FeSO}_4/\text{g}$ . Los valores de todos los resultados obtenidos de la prueba de poder antioxidante reductor de hierro se muestran en los apéndices G y H.

Los valores obtenidos en esta investigación fueron bajos comparados con lo reportado por Keles y col. (2011) con 11600 y 2385.71  $\mu\text{M de FeSO}_4/\text{g}$  de extractos metanólicos de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus dryinus*, respectivamente. De forma contraria, la actividad antioxidante reportada del extracto metanólico del hongo *Hydnum repandum* fue de 145.50  $\mu\text{M de FeSO}_4/\text{g}$ , este último valor es menor al reportado en esta investigación por el P Po83 con  $166.50 \pm 0.10 \mu\text{M de FeSO}_4/\text{g}$ . Lo y Cheung (2005), Choi y col. (2006) y Ferreira y col. (2007) sugieren que los resultados obtenidos por la prueba de poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) se debe a los polifenoles encontrados en los extractos de los hongos.



**Figura 21.** Poder antioxidante reductor de hierro de hongos deshidratados



**Figura 22.** Poder antioxidante reductor de hierro de hongos frescos

M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición

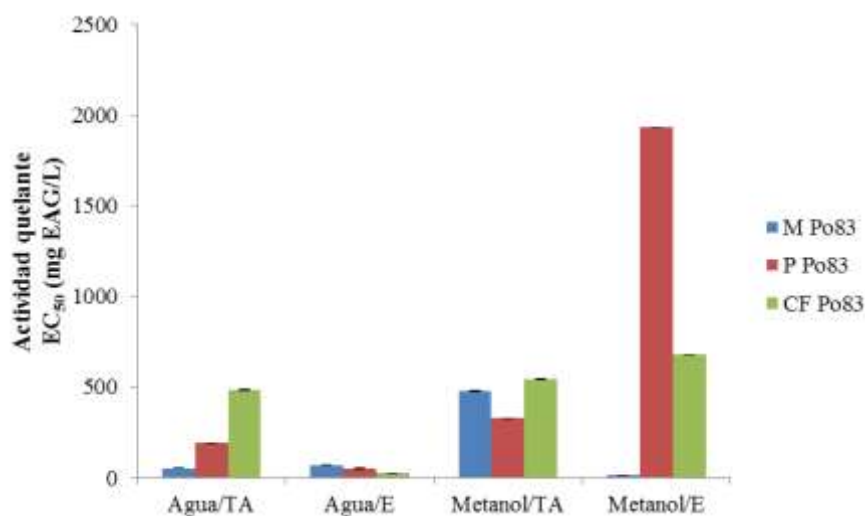
## 7.5 Actividad quelante de iones metálicos

La actividad quelante de los extractos de *Pleurotus ostreatus* y sus distintas fases de crecimiento se determinó por el comportamiento ascendente del porcentaje de quelación del metal con respecto a la concentración de la muestra. En general, todos los extractos presentaron actividad quelante de iones metálicos (figuras 23 y 24). Los mejores extractos obtenidos con el hongo y sus distintas fases de crecimiento deshidratadas fueron el extracto metanólico de M Po83 y el CF Po83, ambos obtenidos por ebullición, con un valor de  $EC_{50} = 13.17 \pm 0.13$  y  $25.53 \pm 0.80$  mg EAG/L, respectivamente. Los extractos restantes de muestras deshidratadas presentaron valores de  $EC_{50}$  mayores, desde  $51.76 \pm 1.20$  hasta  $1932.06 \pm 0.95$  mg EAG/L (figura 23).

Con respecto a la actividad quelante de extractos obtenidos del hongo y sus distintas fases de crecimiento frescas, el extracto acuoso del CF Po83 obtenido por ebullición fue el mejor con un valor de  $EC_{50}$  de  $42.40 \pm 0.72$  mg EAG/L. Los extractos restantes de muestras frescas presentaron valores de  $EC_{50}$  mayores, desde  $171.40 \pm 0.70$  hasta  $501.80$  mg EAG/L (figura 24). Los valores de los resultados obtenidos de la actividad quelante se muestran en los apéndices I y J.

Chye y col. (2008) reportaron la actividad quelante de extractos de éter de petróleo y metanol (obtenidos a temperatura ambiente) de los hongos *Pleurotus* sp. y *P. florida*. Los extractos de éter de petróleo mostraron valores de  $EC_{50} = 16.26$  y  $400$  mg EAG/mL y los metanólicos  $EC_{50} = 2.01$  y  $260$  mg EAG/mL para *Pleurotus* sp. y *P. florida*, respectivamente. El extracto metanólico de M Po83 deshidratado (obtenido por ebullición) mostró mayor actividad quelante ( $EC_{50} = 13.17 \pm 0.13$ ) que los extractos de éter de petróleo de *Pleurotus* sp. y *P. florida*. El extracto metanólico de *P. florida* presentó un valor de  $EC_{50}$  mayor comparado con los extractos acuosos (obtenidos por ebullición) de cuerpos fructíferos frescos y deshidratados de esta investigación ( $EC_{50} = 25.53 \pm 0.80$  y  $42.4 \pm 0.72$  mg EAG/L). De forma contraria, el extracto metanólico de *Pleurotus* sp. presentó un valor de  $EC_{50}$  menor que los obtenidos por esta investigación (los datos de comparación fueron recalculados de los datos originales del autor).

Por su parte, Nuran y col. (2012) reportaron actividad quelante de extractos metanólicos del hongo *Pleurotus eryngii* deshidratado, colectado de tres diferentes regiones de Tunceli, provincia de Turquía ( $EC_{50} = 470.23, 218.31$  y  $292.99$  mg EAG/mL para la región de Ovacik, Pulumur y centro de la ciudad). Los resultados anteriores comparados con los obtenidos en esta investigación, muestran que el valor obtenido de la primera región (Ovacik) fue mayor que la reportada por el extracto acuoso obtenido a temperatura ambiente y ebullición del CF Po83 fresco, con un valor de  $EC_{50} 412.60 \pm 0.95$  y  $42.40 \pm 0.72$  mg EAG/L, el extracto metanólico obtenido a temperatura ambiente del CF Po83 fresco ( $171.40 \pm 0.70$  mg EAG/L) y el extracto acuoso obtenido por ebullición del CF Po83 deshidratado ( $25.53 \pm 0.80$  mg EAG/L). El valor de  $EC_{50}$  obtenido de la segunda y tercera región (Pulumur y centro de la ciudad) fue, nuevamente, mayor en comparación con los extractos acuosos (obtenido por ebullición) del CF Po83 deshidratado y fresco, con valores de  $EC_{50} = 25.53 \pm 0.80$  y  $42.40 \pm 0.72$  mg EAG/L.



**Figura 23.** Actividad quelante de iones metálicos de hongos deshidratados

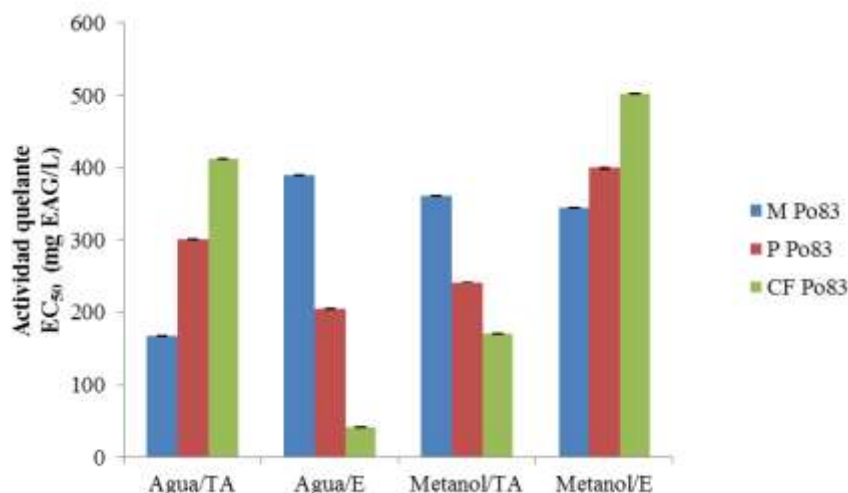
M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición





**Figura 24.** Actividad quelante de iones metálicos de hongos frescos

### 7.6 Poder reductor

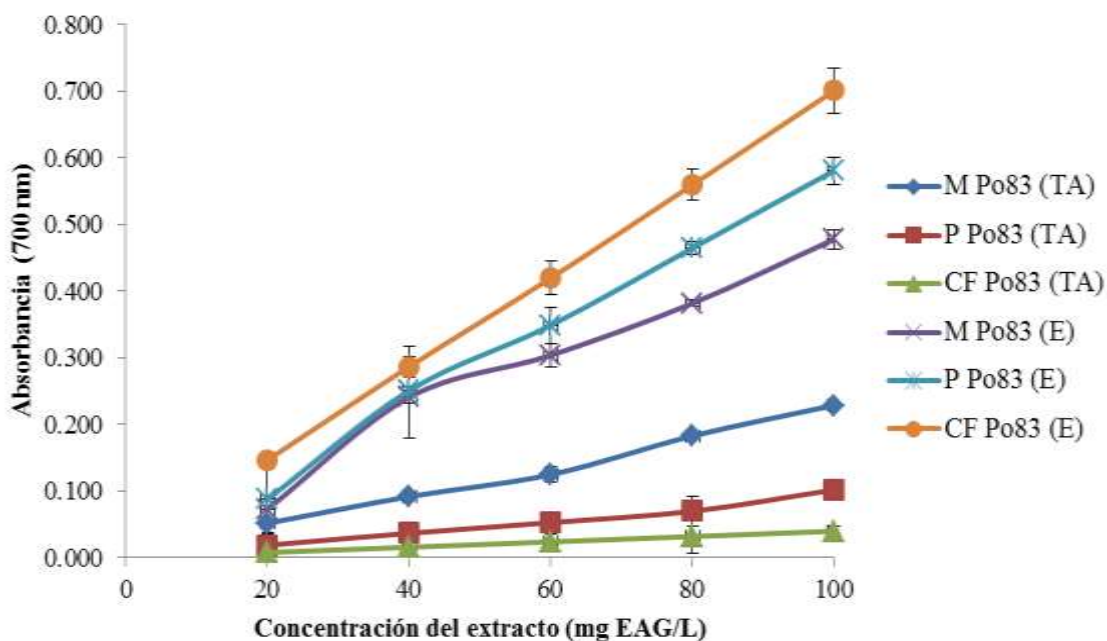
El poder reductor de todas las muestras fue dependiente de la concentración (figuras 25, 26, 27 y 28), con excepción del extracto acuoso obtenido a temperatura ambiente de M Po83. Para la determinación del poder reductor del ión  $Fe^{3+}$ , se ajustaron diferentes concentraciones de los diferentes extractos (mg EAG/L) para el seguimiento de la reducción del ion  $Fe^{2+}$ . En general, los extractos de las muestras deshidratadas mostraron mayor poder reductor que los extractos de las muestras frescas. Asimismo, los extractos acuosos mostraron mayor poder reductor en comparación con los extractos metanólicos. En el caso de los extractos de muestras deshidratadas, el mejor extracto con poder reductor fue el extracto acuoso obtenido por ebullición del CF Po83 con un valor de  $0.701 \pm 0.034$  y el extracto metanólico obtenido a temperatura ambiente de M Po83 con  $0.645 \pm 0.009$ , ambos a una concentración de 100 mg EAG/L (figuras 25 y 26).

Para los extractos de muestras frescas, los mejores extractos fueron el acuoso del CF Po83 obtenido por ebullición con un valor de  $0.439 \pm 0.010$  (figura 27) y los metanólicos del P Po83 y CF Po83 ambos obtenidos por ebullición con valores de  $0.269 \pm 0.003$  y  $0.251 \pm 0.005$ , respectivamente (figura 28), ambos a concentración de 500 mg EAG/L. Los valores de las absorbancias obtenidas de la prueba de poder reductor se muestran en los apéndices K y L.

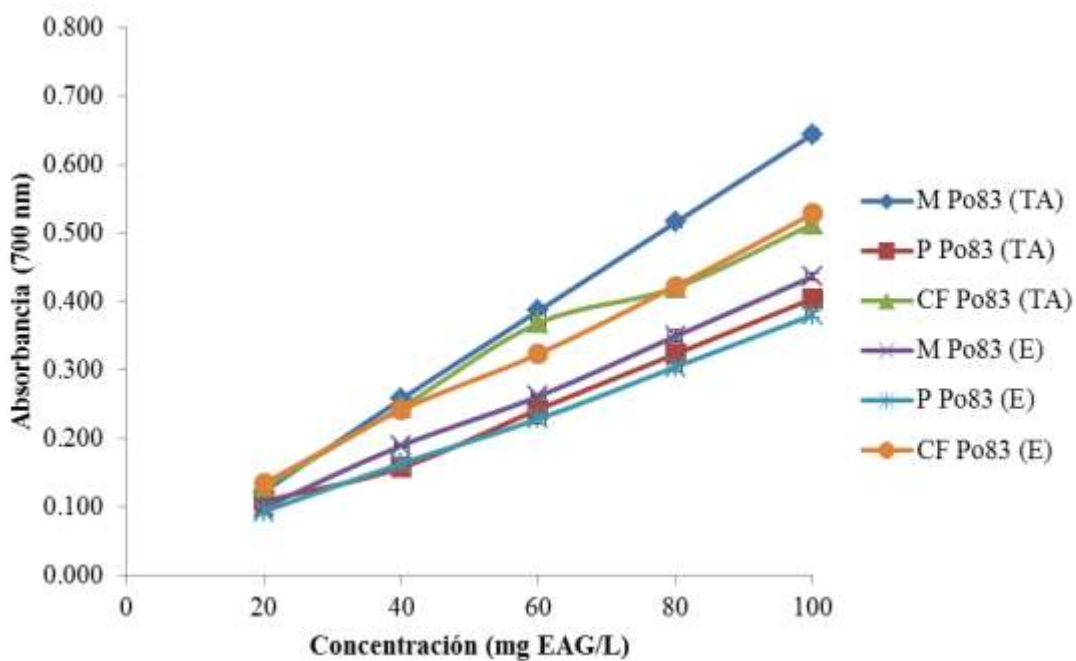
Los resultados obtenidos por diferentes autores se han reportado en diferentes unidades y concentraciones. Estos aspectos hacen de los resultados difíciles de comparar; sin embargo, se presentan algunos resultados obtenidos por distintos investigadores.

Arbaayah y Umi (2013) reportaron el poder reductor de un extracto etanólico de *Pleurotus djamor* var. *djamor* con una absorbancia de 0.874 a 10 mg de muestra/L, a esta especie de *Pleurotus* le sigue *Pleurotus djamor* var. *roseus* (0.771), *Schizophyllum commune* (0.568), *Pleurotus pulmonarius* (0.429) y finalmente *Pleurotus ostreatus* (0.397). El poder reductor que presentaron los diferentes extractos reportados por estos autores sugieren que puede ser debido a la habilidad de la donación de hidrógenos que presentan los compuestos fenólicos (Shimada y col. 1992; Okoro 2012; Arbaayah y Umi 2013). Así, la prueba de poder reductor puede indicar el potencial antioxidante de los compuestos evaluados (Meir y col. 1995).

Sudha y col. (2012) reportaron una absorbancia de 0.673 del extracto acuoso del cuerpo fructífero de *Pleurotus eous*, a 2 mg de muestra seca/mL. Asimismo, Jeng-Leun y col. (2002) reportaron el poder reductor extractos metanólicos, obtenidos en frío, de los hongos *Ganoderma lucidum* (Ling-chih), *Ganoderma tsugae* (Sung-shan-ling-chih) y *Coriolus versicolor* (Yun-chih). A 4 mg de muestra/mL, se obtuvieron absorbancias de 2.38 para *Ganoderma tsugae*, seguido de *Ganoderma lucidum* con 1.62 y *Coriolus versicolor* con 0.790. Finalmente, Barros y col. (2007) evaluaron el poder reductor de los extractos metanólicos obtenidos por ebullición de los hongos *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* y *Agaricus arvensis*. A 5 mg/mL los extractos metanólicos presentaron una absorbancia de 0.670, 0.730 y 1.47, respectivamente.

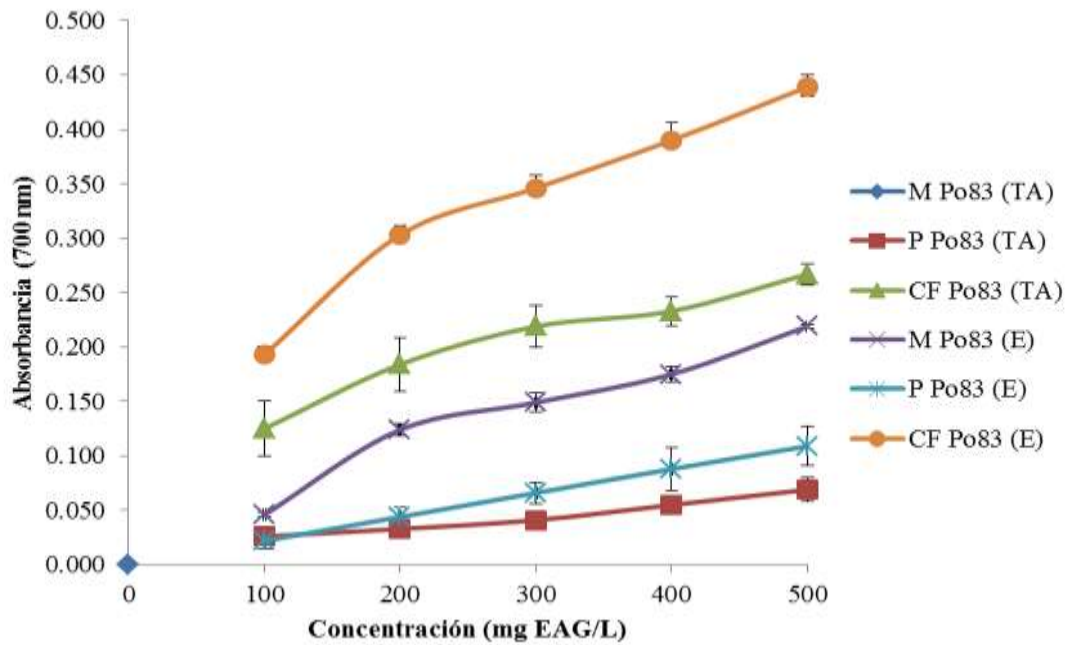


**Figura 25.** Poder reductor de extractos acuosos de hongos deshidratados

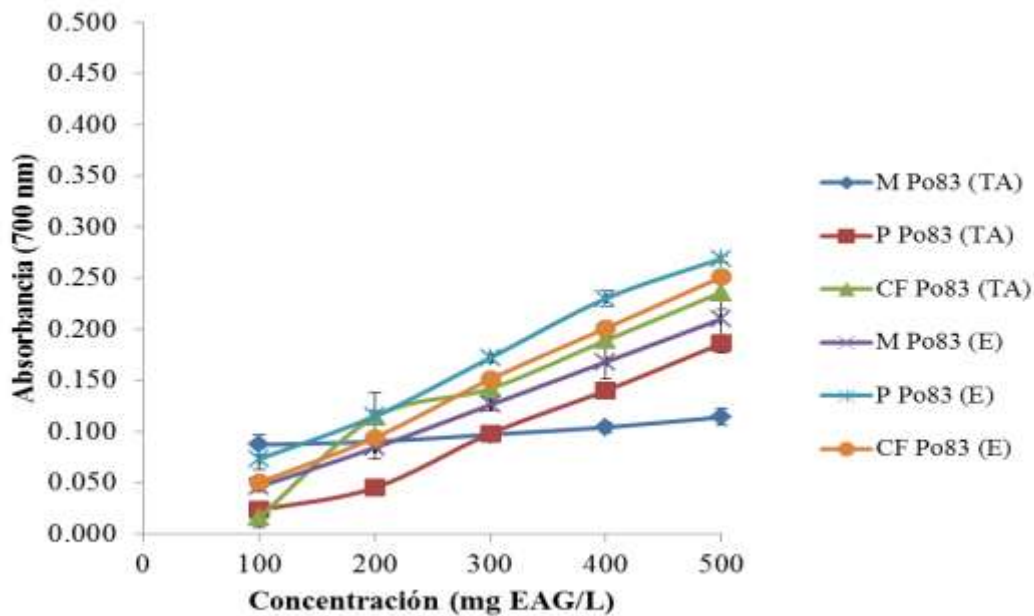


**Figura 26.** Poder reductor de extractos metanólicos de hongos deshidratados

M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783  
P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783  
CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783  
TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición



**Figura 27.** Poder reductor de extractos acuosos de hongos frescos



**Figura 28.** Poder reductor de extractos metanólicos de hongos frescos

M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783  
P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783  
CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783  
TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición

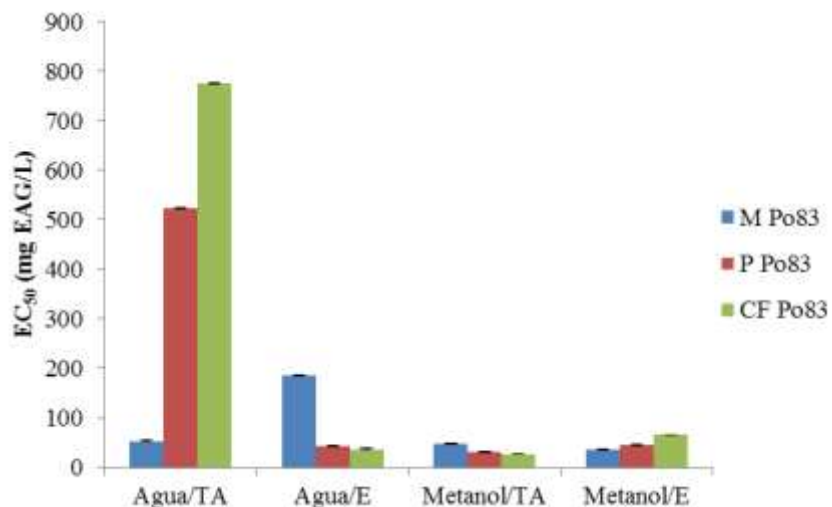
## 7.7 Actividad reductora del radical DPPH

La reducción del radical de DPPH fue positivamente relacionada con la concentración del extracto. En general, los extractos de muestras deshidratadas mostraron mayor actividad reductora del radical DPPH. En esta prueba se observó que los valores de  $EC_{50}$  de los extractos metanólicos fueron mejores que en los extractos acuosos, en muestras frescas y deshidratadas. Para los extractos obtenidos con muestras deshidratadas, los mejores extractos fueron los metanólicos de CF Po83 y P Po83 obtenidos a temperatura ambiente con valores de  $EC_{50} = 26.99 \pm 0.47$  y  $30.89 \pm 1.83$  mg EAG/L (figura 29). Los extractos acuosos y metanólicos restantes de muestras deshidratadas, también, presentaron actividad reductora del radical DPPH sin embargo sus valores de  $EC_{50}$  fueron elevados, desde  $36.18 \pm 1.48$  hasta  $775.93 \pm 1.28$  mg EAG/L.

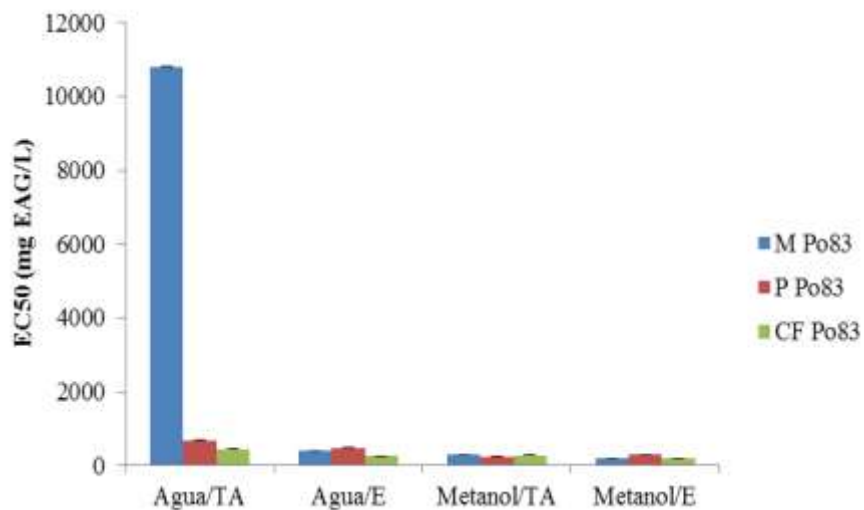
Para el caso de los extractos obtenidos con muestras frescas, los mejores extractos fueron los metanólicos, ambos obtenidos por ebullición, del CF Po83 y M Po83 con valores de  $EC_{50} = 185.30 \pm 0.99$  y  $189.70 \pm 1.11$  mg EAG/L (figura 30). Los extractos acuosos y metanólicos restantes de muestras frescas, también, presentaron actividad reductora del radical DPPH sin embargo sus valores de  $EC_{50}$  fueron elevados, desde  $241.20 \pm 0.95$  hasta  $10808 \pm 0.16$  mg EAG/L. Los valores de los resultados obtenidos de la actividad reductora del radical DPPH se muestran en los apéndices M y N.

Keles y col. (2011) reportaron actividad reductora del radical DPPH de un extracto metanólico de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus dryinus*, *Boletus edulis* y *Pleurotus ostreatus* con valores de  $EC_{50} =$  de 78.43, 58.06, 38.31 y 29.66 mg EAG/mL. Estos valores fueron más altos comparados con los obtenidos en esta investigación del extracto metanólico obtenido a temperatura ambiente del CF Po83 deshidratado ( $EC_{50} = 26.99$  mg EAG/L).

Shirmila y Radhamany (2013), también, reportaron la actividad reductora del radical DPPH de un extracto metanólico de *Macrolepiota mastoidea*, obtenido con el equipo Soxhlet, con un valor de  $EC_{50}$  de 20.35 mg EAG/mL. Los valores de  $EC_{50}$  reportados por Shirmila y Radhamany (2013) y Keles y col. (2011) fueron recalculados de los valores originales reportados en las investigaciones.



**Figura 29.** Actividad reductora del radical DPPH de hongos deshidratados



**Figura 30.** Actividad reductora del radical DPPH de hongos frescos

M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

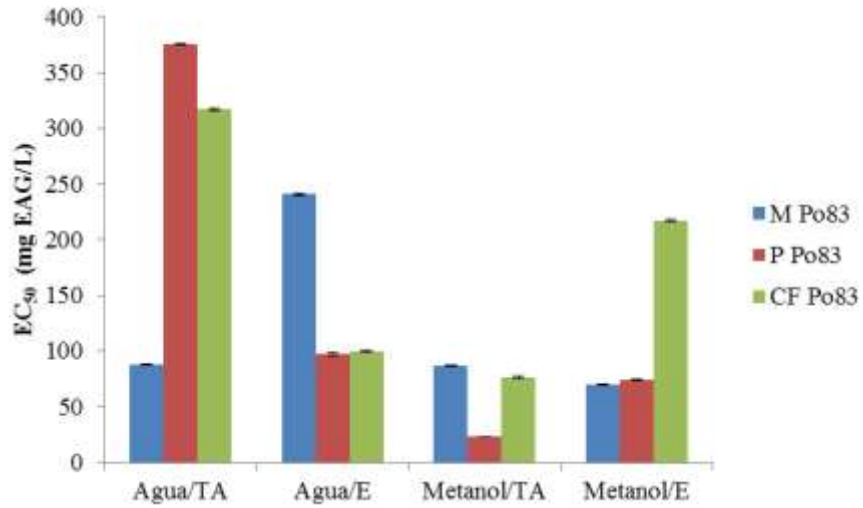
CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición

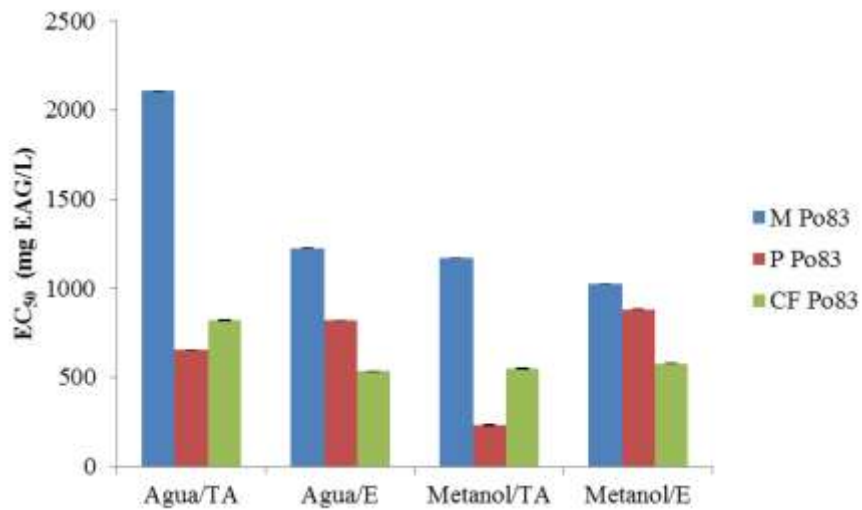
## 7.8 Actividad reductora del radical ABTS

La actividad reductora del radical ABTS fue positivamente correlacionada con la concentración del extracto. En los resultados obtenidos en esta investigación, las muestras deshidratadas mostraron mayor actividad reductora del radical ABTS en comparación con las muestras frescas. En general, los extractos metanólicos de hongos deshidratados presentaron mayor actividad. El mejor extracto fue el de P Po83 obtenido a temperatura ambiente con un valor de  $EC_{50} = 22.89 \pm 0.37$  mg EAG/L (figura 31). Con respecto a los extractos acuosos y metanólicos obtenidos de muestras frescas, los valores de  $EC_{50}$  fueron elevados en comparación con las muestras deshidratadas. Sin embargo, el extracto con mayor actividad reductora del radical ABTS fue el metanólico de P Po83 con un valor de  $EC_{50} = 230.30$  mg EAG/L (figura 32).

Shirmila y Radhamany (2013) reportaron la actividad reductora del radical ABTS de un extracto metanólico de *Macrolepiota mastoidea* con un valor de  $EC_{50} = 9.9$  mg EAG/mL (el valor de  $EC_{50}$  se recalculó del valor original reportado por los autores). El valor reportado por estos autores presentó baja actividad reductora en comparación con el extracto metanólico obtenido, en esta investigación, a temperatura ambiente y ebullición del CF Po83 deshidratado con valores de  $EC_{50} = 217.24 \pm 1.31$  y  $76.63 \pm 0.07$  mg EAG/L, respectivamente. Finalmente, Guzmán y col. (2009) reportaron la actividad reductora del radical ABTS de un extracto metanólico obtenido a temperatura ambiente del hongo *Pleurotus djamor* ( $EC_{50} = 0.0293$  mg de muestra/mL). Distintos autores han reportados sus resultados con distintas unidades lo que hace de los resultados difíciles de comparar. Los valores de los resultados obtenidos de la actividad reductora del radical ABTS se muestran en los apéndices O y P.



**Figura 31.** Actividad reductora del radical ABTS de hongos deshidratados



**Figura 32.** Actividad reductora del radical ABTS de hongos frescos

M Po83 = Micelio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

P Po83 = Primordio de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

CF Po83 = Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783

TA=extracto obtenido a temperatura ambiente, E=extracto obtenido por ebullición



## 7.9 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas reveló en algunas muestras principalmente del extracto acuoso y metanólico del CF Po83 deshidratado la presencia del ácido metiltartrónico (TR 20.185) (figuras 33 y 34). Los sinónimos del ácido metiltartrónico son ácido málico, ácido isomálico, ácido 2,2-dihidroxi-3-oxobutanoico, ácido 2-metiltartrónico, ácido 2 hidroxil-2-metilpropanodioico, 2 hidroxil-2-metilmalonato, ácido hidroximetilpropanodioico. Los resultados obtenidos de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se muestran en la tabla 5. A la presencia de este ácido en los extractos se le puede atribuir una parte de la actividad antioxidante.

Se sabe que el ácido málico tiene un efecto retardador de la degradación oxidativa de los lípidos. En los usos alimentarios se utiliza en la estabilización de aceites y grasas comestibles (aceite de soja, linoleato de metilo en un sistema acuoso y aceite de oliva) y en los no alimentarios en barnices y sustancias selladoras entre otros. También protege el sabor de huevos duros, actúa como antioxidante, estabilizador y desoxigenante en recipientes cerrados (Maestro-Durán y Borja-Padilla 1993). Los ácidos orgánicos, como el ácido málico, tartárico y cítrico, entre otros, juegan un rol determinante en mantener la calidad de frutas y vegetales y las características organolépticas; asimismo, tienen un rol protector en contra de varias enfermedades debido a la actividad antioxidante que presentan, estos son capaces de quelar metales o deslocalizar la carga electrónica de los radicales libres (Camara y col. 1994; Seabra y col. 2006). La naturaleza y concentración de estos compuestos son importantes en el sabor de los hongos (Valentão y col. 2005; Ribeiro y col. 2006)

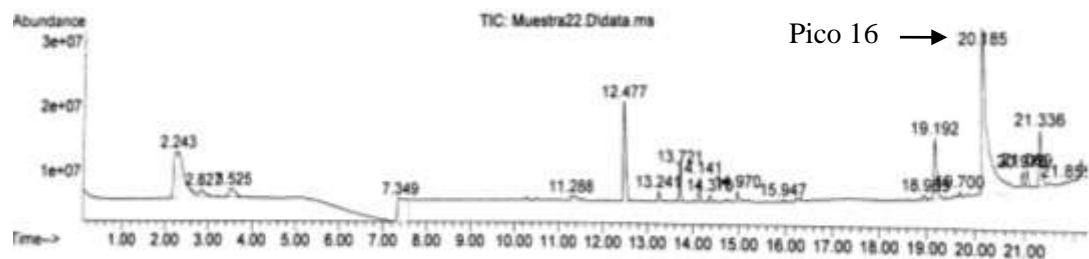
Barros y col. (2013) realizó una investigación con 48 especies de hongos al noreste de Portugal a los que les analizó el perfil de ácidos contenidos. En los resultados encontraron el ácido málico en la mayoría de las especies de hongos, el hongo *Sarcodon imbricatus* presentó el mayor contenido de este ácido con 240.65 mg/g en peso seco. Finalmente, sugieren que las altas cantidades de ácidos orgánicos presentes en las distintas especies de hongos podrían estar relacionado con la actividad antioxidante.

Por otro lado, en hongos como *Amanita caesarea*, *Boletus edulis*, *Gyroporus castaneus*, *Lactarius deliciosus*, *Suillus collinitus* y *Xeroocomus chrysenteron* se ha detectado un perfil compuesto de al menos cinco ácidos orgánicos: ácido cítrico, cetoglutárico, málico, succínico y fumárico. Asimismo, se sabe que estos ácidos orgánicos pueden tener un rol protector en contra de distintas enfermedades debido a su actividad antioxidante (Valentao y col. 2005). Por su parte, Petrović y col. (2015) reportaron el perfil de ácidos orgánicos de los hongos *Agrocybe aegerita* (Brig.). El ácido orgánico más abundante fue el ácido málico (1.82 g/100 g), seguido del ácido cítrico (0.88 g/100 g), ácido fumárico (0.26 g/100 g) y ácido oxálico (0.09 g/100 g). En el año 2016, Kouassi y col. reportaron la presencia de ácidos orgánicos en hongos ectomicorrízicos (*Lactarius subsericatus*, *Cantharellus platyphyllus* y *Amanita rubescens*). Entre los ácidos se encontraron ácido oxálico, ascórbico, fumárico, cítrico, málico y succínico. El ácido málico fue detectado en *L. subsericatus* y *A. rubescens* con  $2156.70 \pm 17.09$  y  $976.70 \pm 04.04$  mg/kg en peso seco. Este ácido se sabe que contribuye al sabor agridulce de frutas, es utilizado como aditivo en alimentos y se ha reportado también en el hongo silvestre *Macrolepiota procera*.

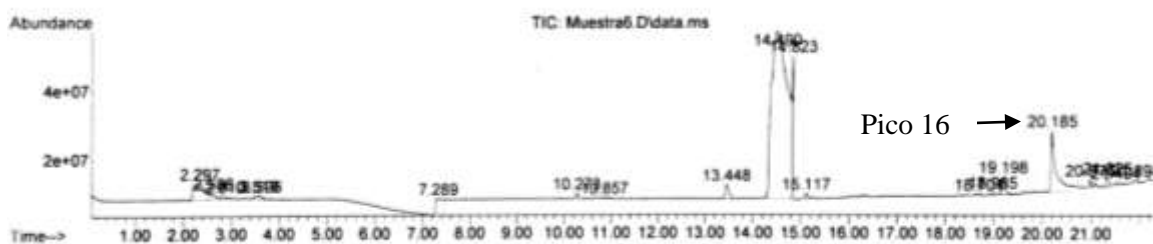
Se pueden encontrar diferencias entre los distintos resultados reportados de ácidos orgánicos por distintos autores. Esto se puede deber a numerosos factores como las diferentes metodologías, condiciones de extracción, cepas, año de colección y localización de las cepas utilizadas (Manzi y col. 2004).

**Tabla 5.** Compuesto encontrado en extractos de hongos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Extracto	Núm. de pico	Tiempo de retención (min)	% total	Compuesto encontrado
Acuoso del cuerpo fructífero deshidratado, obtenido a temperatura ambiente	16	20.185	37.94	Ácido metiltartrónico
Metanólico del cuerpo fructífero deshidratado, obtenido a temperatura ambiente	16	20.185	7.79	Ácido metiltartrónico



**Figura 33.** Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto acuoso del cuerpo fructífero deshidratado, obtenido a temperatura ambiente



**Figura 34.** Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto metanólico del cuerpo fructífero deshidratado, obtenido a temperatura ambiente

Cabe destacar que durante la realización de esta investigación también se realizaron extractos (obtenidos solo a temperatura ambiente, debido a la toxicidad que pueden presentar los disolventes al calentarlos) del hongo en sus distintas fases de crecimiento en fresco y deshidratado con los disolventes diclorometano y hexano. A los extractos, también se les realizó determinación de polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante por los métodos de FRAP, poder reductor, actividad quelante y actividad reductora de los radicales DPPH y ABTS. Sin embargo, dada la baja polaridad de estos disolventes no se presentaron compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por ningún método utilizado en esta investigación. Nuestro estudio coincide con lo reportado por Hip y col. (2009) en no encontrar polifenoles totales y flavonoides en extractos obtenidos con hexano, de distintas especies de hongos.

### **7.10 *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 comparado con hongos comerciales**

Durante la realización de esta investigación se utilizaron los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, así como *Agaricus bisporus* blanco (champiñón) y *Agaricus bisporus* café (portobello) de cepas comerciales (obtenidas de un supermercado). Los extractos realizados con estos hongos solo se utilizaron para fines de comparación con el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 analizadas por todos los métodos y tratamientos utilizados en esta investigación. La comparación se realizó con los mejores extractos de hongos en cada prueba realizada.

En la determinación de polifenoles totales de los extractos acuosos de muestras deshidratadas, obtenidos a temperatura ambiente, el extracto del CF Po83 fue mejor por 5.85 y 6.91 veces más que el extracto de *Pleurotus ostreatus* comercial y *Agaricus bisporus* café, respectivamente. De forma contraria, el extracto acuoso de muestras deshidratadas de *Agaricus bisporus* blanco fue mejor por 0.7 veces más que el extracto del CF Po83. Los valores obtenidos por los extractos acuosos y metanólicos restantes de *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* blanco y café no superaron el valor obtenido por el extracto acuoso, obtenido a temperatura ambiente del CF Po83. Para la determinación de polifenoles en extractos de muestras frescas, los extractos acuosos y metanólicos (obtenidos a temperatura ambiente y ebullición) del CF Po83 superaron los valores obtenidos de los extractos de *Pleurotus ostreatus* comercial. De forma contraria, *Agaricus bisporus* blanco superó por 30.15 veces más el extracto metanólico (obtenido por ebullición) de *Pleurotus ostreatus* en la fase de primordio.

Para la determinación de flavonoides de extractos con muestras deshidratadas, el extracto acuoso (obtenido por ebullición) de *Agaricus bisporus* blanco y café superaron por 68 y 18 veces más, respectivamente, al mejor extracto M Po83 encontrado en el mismo tratamiento. Los valores obtenidos de los extractos acuosos y metanólicos restantes no logran superar el extracto acuoso de M Po83 (obtenido por ebullición). En los extractos obtenidos de las muestras frescas, el extracto acuoso de M Po83, obtenido a temperatura ambiente, superó a los hongos *Agaricus bisporus* blanco y café por 0.21 y 0.40 veces más en el mismo tratamiento, respectivamente. Los valores obtenidos de los extractos acuosos y metanólicos restantes no logran superar el extracto acuoso de M Po83 (obtenido a temperatura ambiente).

En la prueba realizada del poder antioxidante reductor de hierro, los valores de los extractos acuosos, obtenidos por ebullición, de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* blanco y café superaron al extracto del CF Po83 por 9.6, 54.8 y 70.13 veces más, respectivamente, bajo el mismo tratamiento. Los extractos ya mencionados fueron los mejores de muestras deshidratadas. En el caso de los extractos elaborados con muestras en fresco, el extracto acuoso, obtenido a temperatura ambiente, de *Agaricus bisporus* blanco superó con 3.63 y 56.23 veces más al extracto metanólico de P Po83 y el acuoso del CF Po83 (ambos obtenidos por ebullición).

Para la prueba de actividad quelante de iones metálicos, los mejores extractos obtenidos con muestra deshidratada fueron el extracto metanólico de M Po83 y el acuoso del CF Po83, ambos obtenidos por ebullición. Estos extractos superan los obtenidos por los extractos de la cepa de *Pleurotus ostreatus* comercial. De forma contraria, el extracto acuoso del hongo *Agaricus bisporus* café superó con 3.31 y 15.68 veces más al extracto metanólico de M Po83 y el acuoso del CF Po83, respectivamente. Con respecto a los extractos obtenidos con muestras en fresco, el extracto acuoso del CF Po83 (obtenido a temperatura ambiente) superó por 86.57, 298.47 y 543.66 veces más al extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* comercial (obtenido por ebullición), el extracto metanólico de *Agaricus bisporus* blanco y el extracto acuoso de *Agaricus bisporus* café (obtenido a temperatura ambiente), respectivamente.

En la prueba de poder reductor de muestras deshidratadas, el extracto acuoso obtenido por ebullición superó en el mismo tratamiento a los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* blanco y café con 0.86, 0.84 y 0.295 veces más, respectivamente. Para los extractos de muestras frescas, el extracto acuoso obtenido del CF Po83 superó el extracto acuoso de *Agaricus bisporus* café (ambos obtenidos por ebullición) con 0.287 veces más. De forma contraria, el extracto acuoso obtenido del CF Po83 fue superado por el extracto metanólico de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus* blanco con 0.83 y 0.067 veces más.

Para la actividad reductora del radical DPPH de los extractos obtenidos con muestras deshidratadas, el extracto metanólico de *Agaricus bisporus* blanco y el acuoso de *Agaricus bisporus* café (ambos obtenidos por ebullición) superaron al extracto metanólico (obtenido a temperatura ambiente) del CF Po83 con 13 y 2.82 veces más. De forma

contraria el extracto metanólico del CF Po83 superó al extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* (obtenido por ebullición) con 17.33 veces más. Para el caso de los extractos obtenidos con muestras frescas, el extracto metanólico de *Agaricus bisporus* blanco (obtenido por ebullición) superó al extracto del CF Po83 del mismo tratamiento con 49.46 veces más. De forma contraria el extracto del CF Po83 fue mejor 81.64 y 94.52 veces que el extracto acuoso de *Agaricus bisporus* café y metanólico de *Pleurotus ostreatus* (ambos obtenidos a temperatura ambiente, respectivamente).

Finalmente, en la actividad reductora del radical ABTS de muestras deshidratadas, el extracto metanólico de P Po83 (obtenido a temperatura ambiente) superó a los extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* café y el metanólico de *Agaricus bisporus* blanco (todos obtenidos por ebullición) con 82.34, 83.67 y 58.38 veces más, respectivamente. En los extractos elaborados con muestras frescas, el extracto metanólico de P Po83 (obtenido a temperatura ambiente) superó a los extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* café y el metanólico de *Agaricus bisporus* blanco (todos obtenidos por ebullición) con 148.07, 977.11 y 257.96 veces más, respectivamente.

## 8. CONCLUSIONES

- En general, todos los extractos acuosos y metanólicos presentaron compuestos fenólicos.
- El contenido de flavonoides representó un mínimo porcentaje del contenido de polifenoles totales.
- La actividad antioxidante de las fases de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* obtenida por los diferentes métodos de evaluación sugiere que no se debe a los polifenoles. La actividad antioxidante podría ser el resultado de la presencia de diferentes moléculas o sustancias no determinadas en esta investigación que, también, están presentes en los extractos.
- La presencia del ácido metiltartrónico en el hongo *Pleurotus ostreatus* podría contribuir a la actividad antioxidante.
- Se sugiere que la actividad antioxidante reportada no depende de las fases de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783. Bien podría ser por el tipo de extracción, disolvente utilizado y la solubilidad de los compuestos encontrados en el hongo.
- No se encontró un patrón de comportamiento entre la actividad antioxidante y las etapas de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783.

## **9. RECOMENDACIONES**

- Purificar compuestos encontrados en los extractos como polisacáridos y proteínas que estén confiriendo actividad antioxidante.
- Realizar pruebas de actividad antimicrobiana con los extractos, acuosos y metanólicos.
- Utilizar distintas metodologías para la extracción de compuestos antioxidantes.
- Evaluar la actividad enzimática de peroxidasa, superóxido dimutasa y catalasa.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adebayo E. A., Oloke J. K., Ayandele A. A. y Adegunlola C. O. 2012. Phytochemical, antioxidant and antimicrobial assay of mushroom metabolite from *Pleurotus pulmonarius* –LAU 09 (JF736658). J. Microbiol. Biotech. Res. 2 (2): 366-374.
- Alexopoulos C. J. y Mims C. W. 1996. Introductory mycology. 4ª edición. John Wiley y Sons, Nueva York.
- Alvarez-Parrilla E., de la Rosa L. A., Martínez N. R. y González Aguilar. 2007. Fenoles totales y capacidad antioxidante de hongos comerciales y silvestres de Chihuahua, México. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 5(5): 329-334.
- A.O.A.C. 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official method of analysis (17th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Arbaayah H. H., y Umi K. Y. 2013. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. Mycosphere. 4(4): 661-673.
- Arboleda Echavarría C. 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.
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. 2000. Official Method of Analysis, 17th ed. Washington, D.C. Association of Official Analytical Chemists.
- Barros L., João Ferreira M., Queirós B., Ferreira C. F. R. I. y Baptista P. 2007. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene y lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chem. 103: 413-419.
- Barros L., Ferreira I. C. F. R. y Baptista P. 2008. Phenolics and antioxidant activity of mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium at different carbon sources. Food Sci. Technol. Int. 14: 47-55.
- Barros L., Falcão S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M. y Ferreira I. C. F. R. 2008. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chem. 111: 61-66.
- Barros L., Dueñas M., Ferreira I., Baptista P. y Santos-Buelga C. 2009. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. Food Chem. Toxicol. 47: 1076-1079.

- Barros L., Pereira Carla. y Ferreira I. C. F. R. 2013. Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by fast liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Anal. Methods*. 6: 309-316.
- Beltrán Delgado Y., Morris Quevedo H. J., de la Cruz E. R., Quevedo Morales Y. y Bermúdez Savón C. 2013. Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 32(2): 121-129.
- Benzie I. F. F. y Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 239: 70-76.
- Breene W. M. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J. Food Prot*. 53: 883-894.
- Cámara M. M., Díez C., Torija M. E. y Cano M. P. 1994. HPLC determination of organic acids in pineapple juices and nectars. *Z. Lebensm-Unters-Forsch*. 198: 52-56.
- Cardona Urrea L. F. 2001. Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *Crónica forestal y del medio ambiente*. Núm. 16.
- Casimir A. y Min D. B. 2008. Chemistry, Nutrition and Biotechnology. En el capítulo 15 antioxidantes. Tercera edición. Editorial CRC Press. 409-413.
- Chia-Chi C., Ming-Hua Y., Hwei-Mei W. y Jiing-Chuan C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal*. 10(3): 178-182.
- Choi Y., Lee S. M., Chun J., Lee H. B. y Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem*. 99: 381-387.
- Ciappini M. C., Gatti B. y López Zamora M. L. 2004. *Pleurotus ostreatus*, una opción en el menú. Estudio sobre las Gírgolas en la dieta diaria. *Invenio*. 7(12): 127-132.
- Cohen R., Persky L. y Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 58(5): 582-594.
- Cortés R. M., García S. A. y Suárez M. H. 2007. Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. *Revista de la Facultad De Química Farmacéutica*. 14(1): 16-24.

- Díaz-Godínez G., Téllez-Téllez M., Rodríguez A., Obregón-Barbosa V., Acosta-Urdapilleta Ma. de L. y Villegas E. 2016. Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an Airlift reactor. *Bioresources*. 11(2): 4186-4200.
- de Brujin J., Loyola C., Aqueveque P., Cañumir J., Cortéz M. y France A. 2008. Influence of heat treatment on the antioxidant properties of *Grifola gargar* hydro-alcoholic extracts. *Micol. Aplicada Int.* 20(1): 27-34.
- el Hafidi M. y Baños G. 1997. *In vivo* plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hipertension*. 30: 624-628.
- Fatih K., Mustafa O. y Hüsniye K. 2010. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology*. 1(3): 195-199.
- Ferreira I. C. F. R., Baptista P., Vilas-Boas M. y Barros L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushroom from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* 100: 1511-1516.
- Freshney I. 1992. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. En *Animal cell culture. A practical approach*. 2nd edition. The practical approach series USA.
- Gaitán-Hernández R., Salmones D., Pérez-Merlo R. y Mata G. 2004. Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología, Xalapa, Ver. México, 56 pp. (ISBN 970-709-042-1).
- Gan C. H., Nurul A. B. and Asmah R. 2013. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous* and *Agaricus brasiliensis*). *IFRJ*. 20(3): 1095-1102.
- Gil-Ramírez A., Pavo-Caballero C., Baeza E., Baenas N., Garcia-Viguera C., Marín F. R. y Soler-Rivas C. 2016. Mushrooms do not contain flavonoids. *J. Funct. Foods*. 25: 1-13.
- Gioti E. M., Fiamegos Y. C., Skalkos D. C. y Stalikas C. D. 2009. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem.* 117: 398-404.
- Gregori A., Svagel M. y Pohleven J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus*. *App. Food Technol. Biotechnol.* 45: 238-249.

- Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons (Francia). 48: 261-264.
- Gutiérrez-Hernández Daysi. 2016. Efecto de la ingesta de extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* por ratas con consumo prenatal y posnatal de sacarosa en la histología de su tejido adiposo e indicadores bioquímicos. Tesis de maestría de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Guzmán G. 1977. Identificación de los hongos. Ed. Limusa. México D. F.
- Guzmán G. 1994. Fungi in traditional medicine in Mesoamerica and México. Rev. Iberoam. Micol. 11:3 pp 81-85.
- Guzmán M., Zúñiga N., Santafe G. G., Torres O. y Angulo A. 2009. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 7 (2): 63-69.
- Halliwell B., Aeschbach R., Löliger J. y Aruoma O. I. 1995. The characterization of antioxidants. Food Chem. Toxicol. 33: 601-617.
- Herrera T. y Ulloa M. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. México, D.F.
- Hip Seng Y., Fook Yee C., Swee Kheng H. y Chun Wai Ho. 2009. Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. As. J. Food Ag-Ind. 2(03): 392-401.
- Huang D., Ou B. y Prior R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 53(6): 1841-1856.
- Hung P. V. y Nhi N. N. Y. 2012. Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam. Int. Food Res. J. 19(2): 611-615.
- Iwashina T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. J. Plant. Res. 13: 287-299.
- Jan-Ying Y., Li-Hui H., Kaun-Tzer W. y Cheng-Fang T. 2011. Antioxidant properties and antioxidant compounds of various extracts from the edible basidiomycete *Grifola Frondosa* (Maitake). Molecules. 16: 3197-3211.

- Jayakumar T., Sakthivel M., Thomas P. A. y Geraldine P. 2008. *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chem. Biol. Interact.* 176: 108-120.
- Jayakumar T., Thomas P. A. y Geraldine P. 2009. *In vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10: 228-234.
- Jeena G. S., Punetha H., Prakash O., Chandra M. y Kushwaha K. P. S. 2014. Study on *in vitro* antioxidant potential of some cultivated *Pleurotus* species (Oyster mushroom). *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 5(1): 56-61.
- Jeng-Leun M., Hsiu-Ching L. y Chin-Chu C. 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6072-6077.
- Joan-Hwa Y., Hsiu-Ching L. y Jeng-Leun M. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.* 77: 229-235.
- Kalita P., Barman T. K., Pal T. K. y Kalita R. 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum linn.* *JDDT.* 3(4): 33-37.
- Kamal-Eldin A. y Pokorny J. 2005. Ultraviolet-visible spectrophotometry in the analysis of lipid oxidation. *En Analysis of Lipid Oxidation.* AOCS Press. EUA. 17-39.
- Keles A., Koca Í., y Gencelep H. 2011. Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *J. Food Process Technol.* 2: 130.
- Kirk P. M., P. F. Cannon., J. C. David., J. A. Stalpers. *Dictionary of the fungi*, 9a ed. CABInternational. Wallingford, Reino Unido, 655.
- Koltin Y., Stamberg J. y Lemke P. 1972. Genetic structure and evolution of the incompatibility factors in higher fungi. *Bacteriol. Rev.* 36(2): 156-171.
- Kouassi Kouamé Appolinaire, Parfait Kouadio Eugene Jean, Konan Kouassi Humbert, Dué Ahipo Edmond y Kouamé Lucien Patrice. 2016. Phenolic compounds, organic acid and antioxidant activity of *Lactarius subsericatus*, *Cantharellus platyphyllus* and *Amanita rubescens*, three edible ectomycorrhizal mushrooms from center of Côte d'Ivoire
- Kües U. y Liu Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 141-152.

- Kuskoski E. M., Asuero A. G., Troncoso A. M., Mancini-Filho J. y Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 25(4): 726-732.
- Liu R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* 134(12 suppl.): 3479S-3485S.
- Limón-Pacheco J. y Gonsebatt M. E. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 674: 137-147.
- Lo K. M. y Cheung P. C. K. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. Alba. *Food Chem.* 89: 533-539.
- López-Rodríguez C., Hernández-Corredor R., Suárez-Franco C. y Borrero M. 2008. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas scientiarum. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá.* 13(2): 128-137.
- Maestro-Durán R. y Borja-Padilla R. 1993. Actividad antioxidante de esteroides y ácidos orgánicos naturales. *Instituto de la grasa y sus derivados (C.S.I.C).* 44: 208-212.
- Martínez Sánchez G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev. Cubana Farm.* 39(3).
- Manzi P., Marconi S., Aguzzi A. y Pizzoferrato L. 2004. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chem.* 84: 201-206.
- Meir S., Kanner J., Akiri B. y Philosoph-Hadas S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agr. Food Chem.* 43(7): 1813-1819.
- Menaga D., Rajakumar S. y Ayyasamy P. M. 2013. Free radical scavenging activity of methanolic extract of *Pleurotus florida* mushroom. *Int. Pharm. Pharm. Sci.* 5(4): 601-606.
- Mendoza R. y Díaz G. 1981. Las setas. Bilbao, España. Editorial Vizcaina.
- Mercado-Mercado G., Camarillo L. de la R., Wall-Medrano A., López Díaz J. A. y Álvarez Parrilla E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutr. Hosp.* 28(1): 36-46.

- Michel Aceves A. C., Otero Sánchez M. A., Díaz Castro E., Aríza Flores R. y Barrios Ayala A. 2010. Producción de hongos comestibles *Pleurotus* spp. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Campo Experimental Iguala.
- Miliauskas G., Venskutonis P. R. y Van Beek T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85: 231-237.
- Moraes-de-Souza R., Oldoni T., Regitano-d'Arce M. y Alencar S. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Cienc. Technol. Aliment.* 6(1): 41-47.
- Morales J. A. G., Fernández A. M. S., Bautista M. A., Vargas N. M. y Madrigal E. O. S. 2009. Los antioxidantes y las enfermedades crónicas degenerativas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca México Vol. I y II.
- Ndhlala A., Anthonissen R., Stafford G., Finnie J., Verschaeve L. y Van Staden J. 2010. *In vitro* cytotoxic and mutagenic evaluation of thirteen commercial herbal mixtures sold in KwaZulu-Natal, South Africa. *S. Afr. J. Bot.* 76: 132-138.
- Niki E. 2010. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 49(4): 503-515.
- Nuran C. Y., Semra T., Numan, Y. y Olcay Kaplan I. 2012. Antioxidant properties of wild edible mushroom *Pleurotus eryngii* collected from Tunceli province of Turkey. *Dig. J. Nanomater Bios.* 7(4): 1647-1654.
- Okoro O. I. 2012. Antioxidant activities and phenolic contents of three mushroom species, *Lentinus squarrosulus* Mont., *Volvariella esculenta* (Masse) Singer and *Pleurocybella porrigens* (Pers.) Singer. *Int. J. Nutr. Metab.* 4(5): 72-76.
- Pardo V. M. 1995. Hongos fitopatógenos de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Centro de Publicaciones de la Universidad Nacional de Colombia. 166p.
- Petrović J., Glamočlija J., Stojković D., Ćirić A., Barros L., Ferreira I. C. F. R., y Soković, M. 2015. Nutritional value, chemical composition, antioxidant activity and enrichment of cream cheese with chestnut mushroom *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. *J. Food Sci. Technol.* 52(10): 6711-6718

- Pornariya C. y Kanok-Orn I. 2009. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *ScienceAsia*. 35: 326-331.
- Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging*. 2(2): 219-236.
- Ramírez L., Larraya L. y Pisabarro A. 2000. Molecular tools for breeding basidiomycetes. *Int. Microbiol.* 3(3): 147-152.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Reyes Estebanes M., Heredia Abarca G. y Gamboa Angulo M. M. 2008. Perfil biológico de los hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología*. 28: 49-56.
- Ribeiro B., Rangel J., Valentão P., Baptista P., Seabra R. M. y Andrade P. B. 2006. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8530-8537.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. y Paganga P. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(7): 933-956.
- Roginsky V. y Lissi E. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92: 235-254.
- Rojas Ramírez L. 2013. Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoría con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*. 17(1): 49-55.
- Prior L. R., Wu X. y Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Sales-Campos C., Ferreira da Eira A., Almeida Minihoni M. T. de. y Nogueira de Andrade M. C. 2009. Mineral composition of raw material, substrate and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in culture. *Interciencia*. 34(6): 432-436.
- Sánchez C. 1998. Ultrastructural physiological and histological study de *Pleurotus* species. Ph. D. Dissertation. Manchester UK; The University of Manchester.



- Sánchez Hernández C. y Díaz-Godínez G. 2004. Production and uses of edible mushrooms in medicine and ruminant feed. *AgroFOOD industry hi-tech. Biotechnology*. 15: 44-45.
- Sánchez C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1321-1337.
- Sánchez V. J. E. y Mata G. 2012. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. El colegio de la frontera sur. Capítulo VI- 6.6. ISBN 978-607-7637-73-8
- Sarangi I., Ghosh D., Kumar Bhutia S., Kumar Mallick S. y Maiti T. 2006. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *Int. Immunopharmacol.* 6(8): 1287-1297.
- Seabra R. M., Andrade P. B., Valentão P., Fernandes E., Carvalho F. y Bastos M. L. 2006. Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. En: *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. Science Publishers-Enfield (NH) Jersey Plymouth, New Hampshire.
- Seow-Mun H., Amru Nasrulhaq B. y Chandran Somasundram. 2012. Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents in the leaves of different varieties of sweet potato (*Ipomea batatas*). *AJCS*. 6(3): 375-380.
- Sierra-Fernández J. L., López Díaz M. T. y García-Garabal A. E. J. 2002. Setas cultivadas. Sociedad Micológica Leonesa “San Jorge”.
- Singleton V. L., Orthofer R. y Lamuela-Raventós R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Shah Z. A., Ashraf M. y Ishtiaq Ch. M. 2004. Comparative study on cultivation and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates (wheat straw, leaves, saw dust). *PJN*. 3(3): 158-160.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. y Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 40(6): 945-948.
- Shirmila J. G. y Radhamany P. M. 2012. Identification and determination of antioxidant constituents of bioluminescent mushroom. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2: S386-S391.

- Song W., y Leo J. L. D. 2008. Pro-and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *Int. J. Med. Mushrooms*. 10(4): 315-324.
- Stamets P. y Chilton J. S. 1983. *The mushroom cultivator*. Olympia, Washington. Ed. Agarikon Press. Chapter I Introduction to mushroom culture.
- Suárez Arango C. y Nieto I. J. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternative en la obtención de nutraceuticos. *Rev. Iberoam. Micol.* 30(1): 1-8.
- Sudha G., Vadivukkarasi S., Indhu Shree R. B. y Lakshmanan P. 2012. Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. *Food Sci. Biotechnol.* 21(3): 661-668.
- Valentão P., López G., Valente M., Barbosa P., Andrade P. B., Silva B. M., Baptista P., y Seabra R. M. 2005. Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3626-3630
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J. y Cronin M. T. D. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(1): 44-84.
- Vamanu E., Ene M., Vamanu A., Smarandache D., Sarbu I., Popa O., Babeanu N., Nita S. y Veaceslav B. 2011. Antioxidant and antibacterial properties of the extracts from *Pleurotus ostreatus* EVFB1 y EVFB4. *Romanian Biotechnological Letters*. 16(1): 40- 46.
- Velázquez Paniagua M., Prieto Gómez B. y Contreras Pérez R. 2004. Envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*. 75: 36-43.
- Venereo Gutiérrez J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* 31(2): 126-133.
- Vit P., Gutiérrez M. G., Titera D., Bednar M. y Rodríguez-Malaver A. J. 2008. Czech honey categorized according to their antioxidant activity. *Acta Bioquim. Clín. Latinoam.* 42(2):237-244.
- Wainwright M. 1992. *An introduction to fungal biotechnology*. Chapter 3: the production of biochemical by fungi. 36-50.
- Wolfe K. L. y Hai Liu R. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 55(22): 8896-8907.

- Xie Z., Huang J., Xu X. y Jin Z. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.* 111: 370-376.
- Yee Chye F., Yi Wong J. y Jau-Shya Lee. 2008. Nutritional quality and antioxidant activity of selected edible wild Mushrooms. *Food Sci. Technol. Int.* 14: 375-384.
- Yen G. C. y Chen H. Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32.
- Yim H. S., Chye F Y., Ho S. K. y Ho C. W. 2009. Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *As. J. Food Ag-Ind.* 2: 392-401.
- Zhengjun X., Junrong H., Xueming X. y Zhengyu J. 2008. Antioxidant activity of peptides Isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.* 111: 370-376.
- Zuluaga Vega J., Pérez C. C., Angulo A., Torres O. y Glimar Santafé. 2007. Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. *Scientia et Technica.* 33: 329-332.

## 11. APÉNDICES

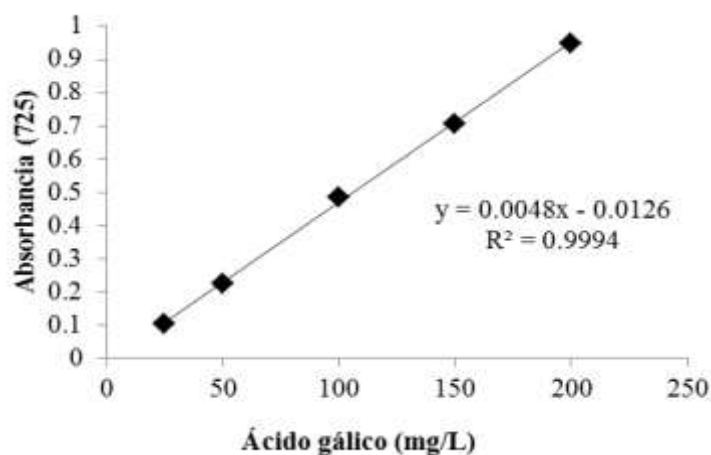
### Apéndice A

#### Curva estándar en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales

En la tabla 6 se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas y las absorbancias (obtenidas a 725 nm) obtenidas para la elaboración de la curva estándar. Asimismo, en la figura 37 se muestra la curva de ácido gálico (mg/L) vs. absorbancia a 725 nm. De la recta obtenida se obtuvo la ecuación para la determinación de polifenoles en equivalentes de ácido gálico.

**Tabla 6.** Concentraciones de ácido gálico y absorbancias obtenidas para la curva estándar de ácido gálico

Ácido gálico [mg/L]	Absorbancia (725 nm)
25	0.103 ± 0.0007
50	0.224 ± 0.0021
100	0.483 ± 0.0361
150	0.706 ± 0.0014
200	0.947 ± 0.0085



**Figura 35.** Curva estándar de ácido gálico

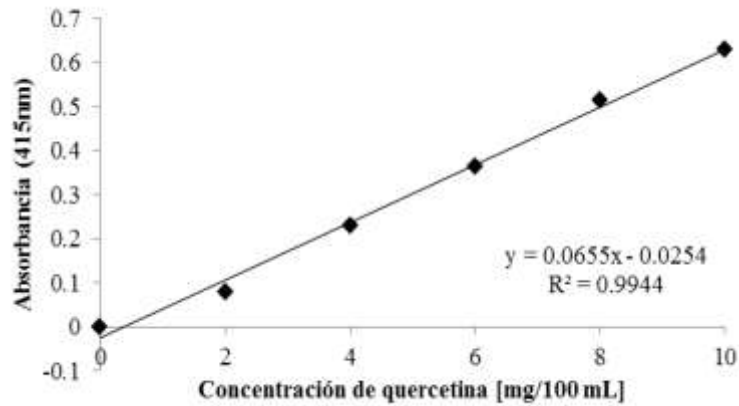
## Apéndice B

### Curva estándar de quercetina para la cuantificación de flavonoides

En la tabla 7 se muestran las concentraciones de quercetina y las absorbancias obtenidas (a 415 nm) obtenidas para la elaboración de la curva estándar. Asimismo, en la figura 38 se muestra la curva de quercetina (mg/100 mL) vs. absorbancia a 415 nm. De la recta obtenida se obtuvo la ecuación para la determinación de flavonoides en equivalentes de quercetina.

**Tabla 7.** Concentraciones de quercetina y absorbancias obtenidas para la curva estándar de quercetina

Quercetina [mg/100mL]	Absorbancia (415 nm)
2	0.078 ± 0.0007
4	0.229 ± 0.0311
6	0.363 ± 0.0382
8	0.513 ± 0.0049
10	0.629 ± 0.0332



**Figura 36.** Curva estándar de quercetina

## Apéndice C

**Tabla 8.** Polifenoles totales de hongos deshidratados

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/g
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	1.65 ± 0.03 <sup>a</sup>
		P Po83	8.94 ± 0.03 <sup>b</sup>
		CF Po83	11.36 ± 0.04 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	4.09 ± 0.23 <sup>a</sup>
		P Po83	4.22 ± 0.20 <sup>a</sup>
		CF Po83	4.65 ± 0.26 <sup>a</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	0.99 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	1.42 ± 0.03 <sup>b</sup>
		CF Po83	2.39 ± 0.02 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.62 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	1.24 ± 0.02 <sup>b</sup>
		CF Po83	1.58 ± 0.04 <sup>c</sup>

## Apéndice D

**Tabla 9.** Polifenoles totales de hongos frescos

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/g
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	5.09 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	4.16 ± 0.02 <sup>b</sup>
		CF Po83	5.05 ± 0 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	8.64 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	4.21 ± 0.01 <sup>b</sup>
		CF Po83	9.92 ± 0.05 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	2.1 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	6.8 ± 0.02 <sup>b</sup>
		CF Po83	4.90 ± 0.02 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	1.52 ± 0 <sup>a</sup>
		P Po83	12.06 ± 0.02 <sup>b</sup>
		CF Po83	7.1 ± 0.02 <sup>c</sup>

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

## Apéndice E

**Tabla 10.** Flavonoides de hongos deshidratados

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EQ/g
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	0.120 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	0.068 ± 0.001 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.069 ± 0.003 <sup>b,c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.192 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	0.143 ± 0.01 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.131 ± 0.01 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	0.026 ± 0.002 <sup>a</sup>
		P Po83	0.025 ± 0.001 <sup>a,b</sup>
		CF Po83	0.049 ± 0.004 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.011 ± 0.001 <sup>a</sup>
		P Po83	0.020 ± 0.003 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.024 ± 0.002 <sup>b,c</sup>

## Apéndice F

**Tabla 11.** Flavonoides de hongos frescos

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EQ/g
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	1.04 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	ND <sup>b</sup>
		CF Po83	ND <sup>b,c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.140 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	0.085 ± 0.01 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.100 ± 0.05 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	0.055 ± 0.01 <sup>a</sup>
		P Po83	0.200 ± 0.003 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.110 ± 0.001 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.077 ± 0.001 <sup>a</sup>
		P Po83	0.734 ± 0.002 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.260 ± 0.002 <sup>c</sup>

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

## Apéndice G

**Tabla 12.** Poder antioxidante reductor de hierro de hongos deshidratados

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	$\mu\text{M de FeSo}_4/\text{g}$
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	$14.79 \pm 1.60^a$
		P Po83	$6.86 \pm 0.38^b$
		CF Po83	$9.70 \pm 0.57^c$
	Ebullición	M Po83	$9.47 \pm 1.60^a$
		P Po83	$17.60 \pm 1^b$
		CF Po83	$33 \pm 0.20^c$
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	$4.22 \pm 0.80^a$
		P Po83	$8.97 \pm 0.25^b$
		CF Po83	$24.53 \pm 1.2^c$
	Ebullición	M Po83	$3.56 \pm 0.13^a$
		P Po83	$6.52 \pm 0.58^b$
		CF Po83	$11.95 \pm 0.23^c$

## Apéndice H

**Tabla 13.** Poder antioxidante reductor de hierro de hongos frescos

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	$\mu\text{M de FeSo}_4/\text{g}$
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	$23 \pm 0.12^a$
		P Po83	$4.87 \pm 0.05^b$
		CF Po83	$19.70 \pm 0.15^c$
	Ebullición	M Po83	$66.40 \pm 0.69^a$
		P Po83	$22.70 \pm 0.19^b$
		CF Po83	$113.90 \pm 0.24^c$
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	$14.80 \pm 0.01^a$
		P Po83	$45.70 \pm 0.15^b$
		CF Po83	$66.90 \pm 0.34^c$
	Ebullición	M Po83	$9.29 \pm 0.04^a$
		P Po83	$166.50 \pm 0.10^b$
		CF Po83	$65.30 \pm 0.42^c$

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )



## Apéndice I

**Tabla 14.** Actividad quelante de iones metálicos de hongos deshidratados

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	54.10 ± 1.10 <sup>a</sup>
		P Po83	192.43 ± 1.25 <sup>b</sup>
		CF Po83	485.27 ± 0.63 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	71.79 ± 1.05 <sup>a</sup>
		P Po83	51.76 ± 1.20 <sup>b</sup>
		CF Po83	25.53 ± 0.80 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	479.02 ± 0.95 <sup>a</sup>
		P Po83	327.96 ± 0.59 <sup>b</sup>
		CF Po83	544.2 ± 0.23 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	13.17 ± 0.13 <sup>a</sup>
		P Po83	1932.06 ± 0.95 <sup>b</sup>
		CF Po83	680.37 ± 0.60 <sup>c</sup>

## Apéndice J

**Tabla 15.** Actividad quelante de iones metálicos de hongos frescos

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	167.70 ± 0.64 <sup>a</sup>
		P Po83	300.80 ± 0.60 <sup>b</sup>
		CF Po83	412.60 ± 0.95 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	389.90 ± 0.61 <sup>a</sup>
		P Po83	205.20 ± 0.72 <sup>b</sup>
		CF Po83	42.40 ± 0.72 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	361 ± 0.37 <sup>a</sup>
		P Po83	241.80 ± 0.50 <sup>b</sup>
		CF Po83	171.40 ± 0.70 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	344.20 ± 0.74 <sup>a</sup>
		P Po83	399.70 ± 1.63 <sup>b</sup>
		CF Po83	501.80 ± 0.78 <sup>c</sup>

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

## Apéndice K

**Tabla 16.** Poder reductor de hongos deshidratados

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	100 mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	0.229 ± 0.002 <sup>a</sup>
		P Po83	0.102 ± 0.005 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.040 ± 0.008 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.478 ± 0.015 <sup>a</sup>
		P Po83	0.581 ± 0.020 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.701 ± 0.034 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	0.645 ± 0.009 <sup>a</sup>
		P Po83	0.405 ± 0.008 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.514 ± 0.011 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.437 ± 0.005 <sup>a</sup>
		P Po83	0.381 ± 0.005 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.529 ± 0.009 <sup>c</sup>

## Apéndice L

**Tabla 17.** Poder reductor de hongos frescos

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	500 mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	ND <sup>a</sup>
		P Po83	0.069 ± 0.011 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.267 ± 0.010 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.219 ± 0.002 <sup>a</sup>
		P Po83	0.109 ± 0.018 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.439 ± 0.010 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	0.114 ± 0.008 <sup>a</sup>
		P Po83	0.186 ± 0.009 <sup>b</sup>
		CF Po83	0.236 ± 0.017 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	0.210 ± 0.023 <sup>a</sup>
		P Po83	0.269 ± 0.003 <sup>a,b</sup>
		CF Po83	0.251 ± 0.005 <sup>a,b,c</sup>

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

## Apéndice M

**Tabla 18.** Actividad reductora del radical DPPH de hongos deshidratados

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	53.57 ± 1.26 <sup>a</sup>
		P Po83	523.17 ± 0.75 <sup>b</sup>
		CF Po83	775.93 ± 1.28 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	185.41 ± 0.80 <sup>a</sup>
		P Po83	43.32 ± 0.94 <sup>b</sup>
		CF Po83	36.86 ± 1.84 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	47.35 ± 1.03 <sup>a</sup>
		P Po83	30.89 ± 1.83 <sup>b</sup>
		CF Po83	26.99 ± 0.47 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	36.18 ± 1.48 <sup>a</sup>
		P Po83	45.64 ± 1.16 <sup>b</sup>
		CF Po83	66 ± 0.24 <sup>c</sup>

## Apéndice N

**Tabla 19.** Actividad reductora del radical DPPH de hongos frescos

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	10808 ± 0.16 <sup>a</sup>
		P Po83	685.40 ± 1.05 <sup>b</sup>
		CF Po83	436.80 ± 0.16 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	389.30 ± 1.19 <sup>a</sup>
		P Po83	474 ± 1.59 <sup>b</sup>
		CF Po83	244.40 ± 0.70 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	283.70 ± 0.80 <sup>a</sup>
		P Po83	241.20 ± 0.95 <sup>b</sup>
		CF Po83	264.70 ± 1.23 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	189.70 ± 1.11 <sup>a</sup>
		P Po83	291.70 ± 0.35 <sup>b</sup>
		CF Po83	185.30 ± 0.99 <sup>c</sup>

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

## Apéndice O

**Tabla 20.** Actividad reductora del radical ABTS de hongos deshidratados

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	88.12 ± 0.41 <sup>a</sup>
		P Po83	375.71 ± 0.76 <sup>b</sup>
		CF Po83	317.09 ± 0.85 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	240.88 ± 0.85 <sup>a</sup>
		P Po83	97.38 ± 1.38 <sup>b</sup>
		CF Po83	99.95 ± 0.82 <sup>b,c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	86.38 ± 0.64 <sup>a</sup>
		P Po83	22.89 ± 0.37 <sup>b</sup>
		CF Po83	76.63 ± 0.07 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	70.13 ± 0.32 <sup>a</sup>
		P Po83	73.78 ± 0.70 <sup>b</sup>
		CF Po83	217.24 ± 1.31 <sup>c</sup>

## Apéndice P

**Tabla 21.** Actividad reductora del radical ABTS de hongos frescos

Disolvente	Tratamiento	Fase de crecimiento	mg EAG/L
Agua	Temperatura ambiente	M Po83	2109 ± 0.08 <sup>a</sup>
		P Po83	653.50 ± 0.33 <sup>b</sup>
		CF Po83	819.30 ± 1.53 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	1225.30 ± 1.52 <sup>a</sup>
		P Po83	817.60 ± 0.95 <sup>b</sup>
		CF Po83	532.50 ± 0.84 <sup>c</sup>
Metanol	Temperatura ambiente	M Po83	1167.20 ± 0.52 <sup>a</sup>
		P Po83	230.30 ± 1.63 <sup>b</sup>
		CF Po83	549.30 ± 0.67 <sup>c</sup>
	Ebullición	M Po83	1023.40 ± 0.14 <sup>a</sup>
		P Po83	880.80 ± 0.30 <sup>b</sup>
		CF Po83	576.30 ± 0.58 <sup>c</sup>

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

## Apéndice Q

### Publicaciones a las que ha dado lugar esta investigación

1. González Palma I., Paredes Ruíz F. M. H., López Sánchez J., Escalona Buendía H., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Antioxidant activity evaluation of metanol extracts of *Pleurotus ostreatus*. 1st Biotechnology World Symposium and 9º Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. 13-16 Octubre 2014 en Tlaxcala, México.
2. González Palma I., Paredes Ruíz F. M. H., Arce Vázquez M. B., López Sánchez J., Buendía Escalona H., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Comparación de la actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Pleurotus ostreatus*. Primer Encuentro Nacional sobre Biotecnología en la UATx. 7-10 de diciembre del 2014, Tlaxcala, Tlaxcala.
3. González Palma I., Escalona Buendía H., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Evaluación de la actividad antioxidante y cuantificación de polifenoles del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783. Cuarto Simposium: Perspectivas en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. 13 de abril de 2015.
4. González Palma I., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Composición polifenólica del hongo *Pleurotus ostreatus* tratados térmicamente. XXX Congreso Nacional de la AMMFEN. Del 5 al 8 de mayo 2015. Cancún, Quintana Roo, México.
5. González Palma I., Paredes Ruiz F. M. H., Serrano Maldonado M. J., Buendía Escalona H., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Actividad antioxidante de diferentes especies de hongos comestibles. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 21-26 de junio 2015, Guadalajara, Jalisco México.
6. González Palma I., Arce Vázquez M. B., Escalona Buendía H., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Determinación de polifenoles y actividad antioxidante de hongos comestibles. II Encuentro Nacional sobre Biotecnología en la UATx. 6-9 de diciembre de 2015.
7. González Palma I., Escalona Buendía H. Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Actividad antioxidante de extractos acuosos de cuerpos fructíferos deshidratados de

*Pleurotus ostreatus*. III Encuentro Internacional sobre biotecnología en la UATx. 4-7 de diciembre de 2016. Tlaxcala, México.

In extenso

1. González Palma I., Arce Vázquez M. B., López Sánchez J., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Actividad antioxidante a diferentes tiempos de extracción del hongo *Pleurotus ostreatus*. IV Congreso Internacional de Avances de las mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las Disciplinas. Creatividad e Innovación. 24-26 de septiembre de 2014. Cd. de México.
2. González Palma I., Paredez Ruíz F. M. H., Arce Vázquez M. B., López Sánchez J., Buendía Escalona H., Díaz Godínez G. y Soriano Santos J. Assessment of the antioxidant activity of methanolic extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. 6th Food Science Biotechnology Safety. Monterrey Nuevo León, Mexico. 8-10 de octubre de 2014. ISBN 978-607-95455-3-6

Artículos

1. González-Palma I., Escalona-Buendía H. B., Ponce-Alquicira E., Téllez-Téllez M., Kumar Gupta V., Díaz-Godínez G. y Soriano-Santos J. 2016. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1099.