



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE UNA CEPA
DE *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr) P. Kummer**

QUE PRESENTA:

CARLOS VILLANUEVA GÓMEZ

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

**DIRECTOR DE TESIS: M. en C. LUIS ANTONIO HERNÁNDEZ
GONZÁLEZ**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicado a mi madre María del Carmen Gómez Ortega, mi padre Carlos Villanueva Gutiérrez, mi hermano Jesús Villanueva Gómez, mi sobrino Nicolas Villanueva González Saravia y a mis primos Saúl, Santiago y Alejandrina Gómez Reyes.

Con mucho cariño a mi abuela Tita, quien me enseñó que la vida además de moléculas y reacciones, también se trata de sonrisas.

También quisiera dedicar este trabajo al profesor José Martínez Aguilar y a mi amigo Félix Castro que con el ejemplo me enseñaron la dedicación a la familia y al trabajo; espero seguir su ejemplo para ser buena persona y amigo, así como ellos lo fueron.

Agradecimientos

Es difícil seguir un orden para agradecer a las personas implicadas en la elaboración de este trabajo y en mi formación como biólogo, pues resultaron diversas situaciones para concluir este anhelo, cuyo fin es contemplar la vida y sus procesos; así que lo haré bajo dos perspectivas: la académica y familiar.

Académicamente quisiera agradecer a mis compañeros que codo a codo estuvieron trabajando en campo y escritorio para aprobar cada una de las asignaturas que tiene esta hermosa carrera.

Al cuerpo docente, sin duda pilares de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, no puedo dejar de agradecer tanta paciencia y comprensión. Algunos profesores ya no se encuentran entre nosotros, pero su pasión por estudiar la vida y el ejemplo de su trabajo me han inspirado a tratar de ser una mejor persona todos los días.

Quisiera agradecer puntualmente a los profesores que colaboraron continuamente en los ensayos experimentales de este proyecto de investigación.

Doctora Ana María García Bores, responsable del laboratorio de Fitoquímica, le agradezco por apoyarme y permitirme el acceso al laboratorio para elaborar la técnica DPPH.

Doctor Luis Arturo Baiza Gutman, encargado del Laboratorio de Biología del Desarrollo, en la Unidad de Morfología y Función, gracias por facilitar los instrumentos necesarios para realizar la técnica Folin Ciocalteu.

Biólogo Alejandro Cruz Monsalvo Reyes, del Laboratorio de Bioquímica Molecular, gracias por auxiliarme en la liofilización de los extractos hidroalcohólicos para este proyecto.

Maestro en Ciencias Luis Antonio Hernández González, agradezco su apoyo y consejo durante la elaboración de este proyecto y en toda mi estancia como estudiante en la carrera de Biología.

Bióloga Soledad Chino Vargas y Biólogo Marcial García Pineda, agradezco sus revisiones y correcciones a este proyecto desde sus inicios en las asignaturas de Laboratorio de Investigación científica y tecnológica.

En lo familiar agradezco mucho el respaldo de mi madre y hermano, que han estado apoyando mis planes y proyectos por más locos o inalcanzables que estos parezcan. Nunca me ha faltado techo, comida y consejo. Un agradecimiento especial a mi hermano Jesús Villanueva Gómez y a su esposa Ana Sofía González Saravia Peña quienes colaboraron con la traducción del abstract para este trabajo.

Y obviamente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Facultad de Estudios Superiores Iztacala mi formación profesional y la oportunidad de conocer a tan maravillosa planta docente.

Índice

Abreviaturas	2
1. Resumen	3
2. Introducción	5
4. El género <i>Pleurotus</i>	15
5. Aspectos nutritivos	20
6. Objetivo General	22
7. Antecedentes	22
8. Materiales y métodos.....	24
9. Resultados y discusión.....	30
11. Recomendaciones.....	40
12. Referencias bibliográficas.....	42

Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
CE50	Concentración necesaria para decolorar el DPPH al 50%
CMIZT	Colección Microbiológica Iztacala
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
GAE	Equivalentes a ácido gálico
MBAR	Milibar
PCR	Reacción de cadena polimerasa
pH	Potencial hidrogeno
rADN	ADN recombinante
RAPD	Random Amplified Polymorphic ADN
RFLP	Restricción fragment length polymorphism
R ²	Coficiente de determinación
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
Stock	Solución madre
Cm	Centímetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
µg	Microgramo

1. Resumen

De una cepa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) P. Kummer, cepa CMIZT-18 donada por el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Jardín Botánico y laboratorio de Química Biológica de la FES-Iztacala se determinaron los fenoles totales por Folin-Ciocalteu, y la actividad antioxidante por la decoloración 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl de tres extractos hidroalcohólicos elaborados con tejido seco pulverizado de cuerpo fructífero.

Los resultados de fenoles totales expresados en miligramos de equivalentes de ácido gálico sobre gramo de tejido seco, fue el siguiente para cada uno de los extractos: acuoso 6.08 ± 0.77 , etanol al 50% 3.66 ± 0.59 y etanol al 75% 3.77 ± 0.42 .

La actividad antioxidante expresada con el índice de decoloración CE_{50} en $\mu\text{g/mL}$ para cada uno de los extractos fue la siguiente: acuoso 2,561.5, etanol al 50%, 2,602 y etanol al 75% 2,056.55.

El extracto acuoso obtuvo la mayor cantidad de fenoles totales, sin embargo, es posible una sobreestimación en la determinación debido a la interacción del carbohidrato xilosa del extracto acuoso con el reactivo de Folin Ciocalteu, la cantidad de fenoles totales en los extractos hidroalcohólicos al 50% y 75% es similar, estadísticamente no hay diferencia entre ellos.

En el ensayo DPPH la actividad antioxidante del extracto etanólico al 75% resultó ser mayor, seguida por el extracto acuoso y finalmente el extracto etanólico al 50%, lo que indica que el extracto con mayor actividad antioxidante es el etanólico al 75%.

Abstract

The total phenols were determined by Folin-Ciocalteu and the antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl of three hydroalcoholic extracts made from powdered dry tissue of the fruiting body of a strain of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) P. Kummer, CMIZT-18 strain donated by the Applied Microbiology Laboratory of the Botanical Garden and the Biological Chemistry Laboratory of FES-Iztacala.

The results of total phenols expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry tissue were as follows for each of the extracts: aqueous 6.08 ± 0.77 , 50% ethanol 3.66 ± 0.59 and 75% ethanol 3.77 ± 0.42 .

The antioxidant activity expressed with the CE₅₀ discoloration index in micrograms per milliliter for each of the extracts was as follows: aqueous 2,561.5, 50%, ethanol 2,602 and 75% ethanol 2,056.55.

The aqueous extract obtained the highest amount of total phenols, however, an overestimation in the determination is possible due to the interaction of the carbohydrate xylose from the aqueous extract with the Folin Ciocalteu reagent, the amount of total phenols in the hydroalcoholic extracts at 50% and 75% are similar, statistically there is no difference between them.

In the DPPH test, the antioxidant activity of the 75% ethanolic extract turned out to be higher, followed by the aqueous extract and finally the 50% ethanolic extract.

2. Introducción

Los hongos son seres vivos unicelulares y pluricelulares, en los segundos sus células forman cuerpos filamentosos ramificados, el conjunto de filamentos se llama *micelio* y cada filamento es llamado *hifa*. Para alimentarse vierten enzimas sobre el sustrato en el que se encuentran, lo degradan en sustancias simples y absorben los nutrientes necesarios para su desarrollo (Sánchez y Royse, 2001).

Tienen un papel importante en la naturaleza, como desintegrador de madera y residuos vegetales, Zaragoza (2011) señaló que junto con las bacterias conforman el grupo de los descomponedores dentro de los ciclos tróficos del carbono, nitrógeno y azufre. Además de su papel en la naturaleza, el hombre le ha dado otros roles a este tipo de organismo: como alimento, degradador, o medicinal; para este último uso, basta con mencionar a Alexander Fleming y la historia de la penicilina (Sánchez y Royse, 2001).

Pleurotus ostreatus, es un hongo prometedor por sus propiedades medicinales exhibiendo actividad hematológica, antiviral, antitumoral, antibiótica, antibacterial, hipocolesterolémica e inmunomoduladora, el uso de su sistema ligninolítico es útil para varias aplicaciones, como: bio-conversor de los desechos de agricultura en alimentos para animales, productos alimenticios para el hombre; finalmente el uso de sus enzimas lignolíticas es útil para la degradación de contaminantes orgánicos, xenobióticos y desechos industriales (Cohen *et al.*, 2002 y García *et al.*, 2007).

Cardona (2003), Daba y Ezeronye (2003), Gregori *et al.* (2007), Zeng *et al.* (2012), Wei S. y Van Griensven (2008), reportaron dos moléculas (antioxidantes y polisacáridos) con actividad anticancerígena y antitumoral en extractos de hongos entre los cuales se menciona a *P. ostreatus*.

En 2006, Pérez propuso que la tendencia en el mundo es el consumo de productos nutraceuticos, los cuales se definen como “sustancias químicas biológicas (orgánicas)” que pueden encontrarse de manera natural en los alimentos o adicionarse a los mismos y resultan especialmente benéficos, tanto para la prevención de enfermedades como en la mejora de las funciones fisiológicas en el organismo, por ejemplo los compuestos fenólicos.

Los nutraceuticos son de interés para científicos, productores y consumidores ya que tienen actividad de protección y preventiva, en la patogénesis de ciertos tipos de cáncer y enfermedades crónicas (Shahidi y Naczka, 2004).

Chegwin en 2014, mencionó que se ha retomado con gran interés el concepto de “alimento funcional” que no es otra cosa que aquel, que debido a sus componentes, tiene la capacidad, no solo de nutrir sino de prevenir y/o tratar diferentes enfermedades. Chegwin insistió en diferenciar entre nutraceutico y nutriceútico. El primero es aquel alimento que puede ser consumido como parte de una dieta y que a la vez aporta nutrientes, ayudando a prevenir la aparición de diferentes malestares y el termino nutriceútico, se utiliza para denominar los compuestos que han sido extraídos de un alimento de origen natural en estudio, sin purificación ni separación de los mismos (extractos concentrados o liofilizados), y que por sus cualidades tanto medicinales como nutricionales se consumen como suplementos de la dieta normal.

Sánchez y Royse (2017), después de hacer una revisión sobre las propiedades antioxidantes de *Pleurotus* spp. desde el año 1971 al 2015, concluyeron que los hongos comestibles y dentro de estos el género *Pleurotus ostreatus* tienen un alto contenido en proteínas, fenoles y moléculas con capacidad antioxidante.

Desde el punto de vista alimenticio en México, hay muchas especies de hongos comestibles y muchas recetas de cocina cuya base son las “setas”, término utilizado en el país para referirse a los hongos del género *Pleurotus* conocidos popularmente como: orejas blancas, orejas de palo, orejas de patancán, orejas de cazahuate y orejas de izote (Gaitán-Hernández, *et al.*, 2006).

El desarrollo de cultivos de esta seta, empezó en México desde 1933, según los reportes de Martínez-Carrera *et al.* (2000). Se estimó que para 1998, la producción comercial era de aproximadamente 1,825 toneladas anuales, hasta entonces se consideró a México como un productor principal de América (Sánchez y Royse, 2001). Para el año 2014, la producción anual fue de 3000 toneladas anuales de acuerdo con Sánchez y Royse (2017). El cultivo de *Pleurotus* spp. ha tenido un gran auge dada la relativa sencillez de su cultivo y por la posibilidad de utilizar recursos que son desechos de actividades agropecuarias (Hernández-González, *et al.*, 2018).

En el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Jardín Botánico y el Laboratorio de Química Biológica en la cabecera L421 de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala hay dos líneas de investigación respecto a *Pleurotus* spp.

- 1) La obtención de glucopéptidos
- 2) La obtención de polifenoles

Se ha reportado que estos dos tipos de compuestos tienen beneficios en la salud y al parecer están implicados en la actividad anticancerígena y antitumoral. En el presente trabajo se optó por la línea de polifenoles, y evaluar la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de una cepa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr) P. Kummer esto debido a la importancia de estudiar una de las especies con mayor producción en México, de gran crecimiento comercial y diversidad de usos.

3. Generalidades de los hongos

3.1 Los hongos

Del griego mykes hongos + phyton planta. La palabra seta u hongo no designa ninguna especie en particular, sino tan solo el cuerpo de distintas variedades. Además de su papel en la naturaleza, el hombre le ha dado otros papeles a este tipo de organismo. Como alimento, degradador, o medicamento. Son un grupo; muy variable y polimórfico difícil de caracterizar, pero cuando se hace referencia a ellos es común mencionar que nacen de esporas, carecen de clorofila, se reproducen sexual y asexualmente, los hay unicelulares como la levadura, pero la mayoría son pluricelulares como los mohos (moho negro del pan), *mildeu*, royas, tizones y setas (Sánchez y Royse, 2001).

Son heterótrofos: saprófitos (aprovechan desechos de organismos o cuerpos muertos) o parásitos (penetran en las células de tejidos vegetales y animales tomando sus nutrimentos del interior de estas); se encuentran donde quiera que exista sustancia orgánica disponible; se desarrollan mejor en lugares oscuros y húmedos. Algunos hongos pueden crecer aún en condiciones desfavorables, como el resistir considerablemente la plasmólisis porque pueden desarrollarse en soluciones concentradas de sal o azúcar, por ejemplo, sobre confitura (Sánchez y Royse, 2001).

La pared externa del cuerpo de los hongos puede estar compuesta de celulosa, quitina o una combinación de ambas. De estructura casi esférica en unicelulares como la levadura y en algunas especies pluricelulares, con estructuras filamentosas llamadas hifas divididas por paredes transversales que separan los núcleos sucesivos. Toda la masa de hifa ramificada que forma un solo hongo se llama micelio, cuyo crecimiento sólo se da en las puntas, por lo que forman masas algodonosas o afelpadas de forma radial, que es común observar en la hojarasca en el suelo de bosques o praderas húmedas (Sánchez y Royse, 2001).

Al ramificarse el micelio, y establecer contactos con sustancia orgánica, secreta enzimas que desdoblan las proteínas, carbohidratos y grasas. Así absorbe productos secundarios: en el moho común del pan -el micelio- se presenta en forma de una masa de hebras entrelazadas sobre la superficie que penetran en el interior del pan; en otros hongos, por ejemplo: las setas, gran parte del micelio se encuentra bajo la tierra; de esta forma muchos hongos intervienen en los ciclos del carbono y nitrógeno. Se distinguen de las plantas porque no almacenan su energía en forma de almidón, en lugar de ello almacenan otros polisacáridos como trehalosa y el glucógeno (Sánchez y Royse, 2001).

Su reproducción puede ser asexual sin involucrar fusión de núcleos, llamada también somática o vegetativa y sexual que involucra fusión de núcleos mediante estructuras características en cada subgrupo. (Sánchez y Royse, 2001). Con base en la reproducción sexual, Villee (1996), distingue cuatro divisiones: Zygomycetes (antes Phycomycetes), Ascomycetes, Basidiomycetes y Fungi imperfecti (antes deuteromycota).

3.2 Basidiomicetos

Los Basidiomycetes o Basidiomicetos (del griego *basidion* - base pequeña y *karpos* - fruto) son un grupo diverso que se caracteriza por producir esporas sexuales en estructuras especializadas llamadas basidiosporas las cuales están unidas o sujetas a los basidios que son cuerpos con forma de mazo unidos a su vez al himenio de las setas (cuerpo fructífero), como se puede observar en la Figura 1. Es de estas esporas de las cuales crecerá el micelio, formado por hifas bien desarrolladas y divididas en septos; estas crecen a través del sustrato obteniendo así su alimento. De manera individual las hifas son microscópicas, pero cuando están en masa como micelio pueden observarse a simple vista (Sánchez y Royse, 2001).

El micelio de la mayoría de los basidiomicetos pasa por tres diferentes etapas de desarrollo, antes de que el hongo complete su ciclo de vida.

a) El micelio primario llamado también homocarión o monocarión, en donde cada compartimiento hifal tiene un solo núcleo. Este estado se desarrolla después de la germinación de la basidiospora.

b) La formación del micelio secundario llamado heterocarión o dicarión, usualmente involucra una interacción entre dos micelios homocarióticos compatibles dando como resultado la fusión de dos hifas que forman un compartimento heterocariótico, es posible ver dos núcleos en cada septo al microscopio. Después de este suceso los micelios antes homocariotes se dicarionizan completamente.

c) el micelio terciario es representado por los tejidos organizados y especializados que comprenden los basidiocarpos de las especies más complejas. Las hifas se entretrejen para formar después de cierto tiempo masas compactas llamadas “yemas” o primordios. La yema da lugar a la estructura a la que se suele llamar seta, formada por estípite (tallo) y píleo (casquete o sombrero). En la cara inferior del casquete se encuentran muchas láminas perpendiculares llamadas laminillas, que se extienden radialmente desde el tallo hasta el borde del casquete. Los basidios se desarrollan sobre las superficies de estas láminas. Cada basidio contiene dos núcleos que se unen para formar un núcleo diploide. A su vez, este sufre división por meiosis, para dar origen a cuatro basidiosporas haploides. El hongo produce millones de basidiosporas, cada una de las cuales, en medio adecuado, puede dar origen a un nuevo micelio (Sánchez y Royse, 2001).

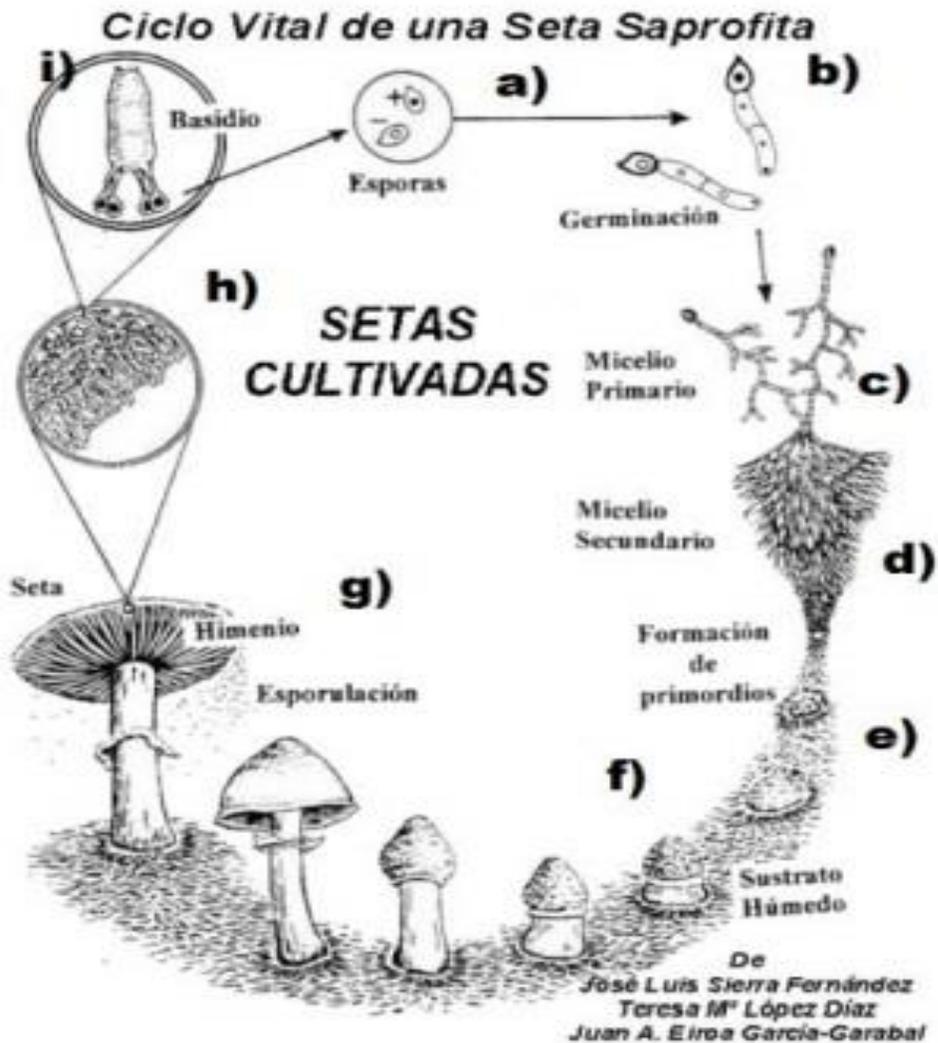


Figura 1. Ciclo de vida de basidiomicetos: a) basidiospora; b) germinación y formación de micelio homocarión; c) fusión de dos micelios homocarión compatibles; d) formación del micelio dicarión; e) formación de primordios; f) desarrollo de carpóforos; g) himenio; h) formación de basidias; i) basidia diferenciada y basidiospora (modificado de <http://setasecas.blogspot.mx/>).

En resumen, los basidiomicetos comprenden las setas, amanitas, royas, tizones y champiñones. Su nombre recuerda que se reproducen sexualmente mediante un basidio, órgano cuya función es similar a la del asco de los ascomicetos. Cada basidio es una célula hifal grande, alargada, en cuyo extremo se desarrollan cuatro basidiosporas fuera del basidio. Una vez libres, producen nuevos micelios si el medio es adecuado. El cuerpo vegetativo está formado por un micelio de hifas pluricelulares. El origen evolutivo de los basidiomicetos es un misterio completo. No tienen relación con ninguna alga y, en general, se piensa que proceden de otros hongos, tal vez de los ascomicetos (Vilée, 1996), Sánchez y Royse, 2001).

3.3 El crecimiento de los basidiomicetos

Puede iniciar a partir de una espora o de una fracción viable de hifa. Dicho crecimiento solo se da de forma polarizada o en la parte apical de la hifa alejándose del centro de la colonia. A la zona apical de la hifa fluye protoplasma proveniente de la zona periférica de crecimiento, esta zona es la que se ubica inmediatamente adyacente al ápice y se caracteriza por aportar protoplasma y enzimas para la elongación celular, además sintetiza materiales precursores de pared. Así como existe un flujo de materiales hacia el ápice, también existe un movimiento de nutrientes desde el ápice hacia el interior de la colonia; esto ha sido demostrado con la glucosa y es probable que suceda con otros nutrientes (Jennings, 1995).

3.3.1 Fases de crecimiento

El crecimiento varía en un medio líquido o sólido. En un líquido en reposo crece solo sobre la superficie, pero si el medio es permanentemente agitado pueden crecer en todo el medio de cultivo. En medio líquido agitado, los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al presentado por otros organismos que consta de las fases de latencia, exponencial, declinación, estacionaria y muerte. En un medio sólido en lugar de fase exponencial se presenta una fase de crecimiento lineal y si se trata de un basidiomiceto puede presentarse fructificación (Sánchez y Royse, 2001). En la figura 2 se puede observar una representación de la curva típica de crecimiento de los microorganismos.

3.3.2 Fase de latencia

Es una etapa de adaptación hay síntesis de componentes para iniciar la elongación. La duración de la fase es muy variable y depende del estado fisiológico del hongo, tipo de sustrato y de las condiciones de cultivo. La fase se minimiza si el hongo es inoculado de una colonia en fase exponencial (Sánchez y Royse, 2001).

3.3.3 Fase exponencial

Después de que se ha adaptado al medio de cultivo y está en la capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que este le ofrece; alcanzará la tasa de crecimiento máxima (Sánchez y Royse, 2001).

3.3.4 Fase de fructificación

Cuando el micelio ha crecido lo suficiente sobre el sustrato y las condiciones lo permiten (temperatura, luz, humedad relativa y cantidad de oxígeno) las hifas se agregan para formar cuerpos fructíferos denominados basidiomas, basidiocarpos o carpóforos (Sánchez y Royse, 2001).

3.3.5 Fase de la declinación

Cuando la acumulación de desechos del metabolismo del hongo alcanza niveles que son limitantes para el crecimiento, algunos nutrientes escasean o se terminan; la tasa de crecimiento máximo no se mantiene y comienza a disminuir. Es la fase propicia para que aparezcan mutaciones celulares debido a que disminuye la presión de selección. Lo anterior puede llevar al agotamiento de la cepa y pérdida de la misma (Sánchez y Royse, 2001).

3.3.6 Fase estacionaria o muerte

En esta fase empiezan a aparecer enzimas autolíticas que conducen a la muerte del hongo. Es el punto en el cual el crecimiento cesa a pesar de que prevalece un metabolismo de mantenimiento. Aún hay consumo de glucosa y otros nutrientes. El hongo aún es capaz de reiniciar crecimiento si es resembrado en un medio propicio, aunque tendrá un periodo de latencia probablemente largo (Sánchez y Royse, 2001).

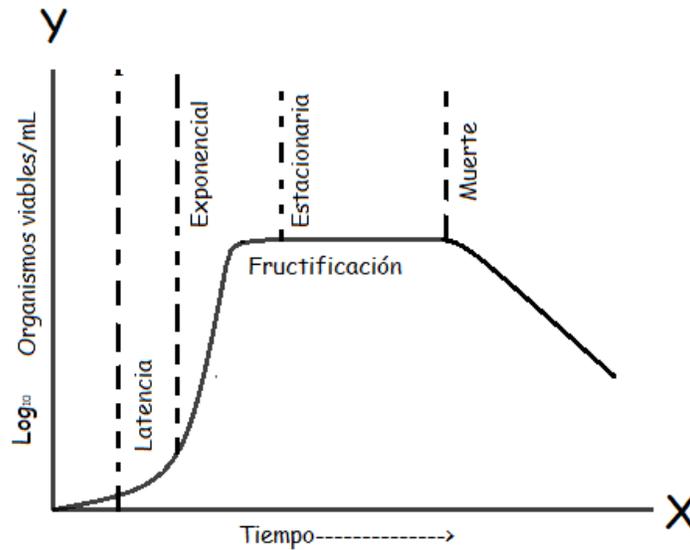


Figura 2. Curva típica de crecimiento de microorganismos

4. El género *Pleurotus*

Se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países. *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm (hongo ostra), es una de las especies mayormente cultivadas (Chang, 1996), la taxonomía del género es muy compleja debido a un alto grado de variabilidad morfológica de los basidiocarpos. Debido a esta, una misma especie puede ser identificada bajo diferentes nombres. Una correcta identificación de la especie de interés evitará gastar tiempo en pruebas genéticas de incompatibilidad entre cepas o colecciones que no guardan ninguna relación genética, Sánchez y Royse (2001). La especie es la unidad fundamental de la clasificación biológica, sin embargo, la definición y la delimitación de ésta puede ser más compleja (Carlile y Watkinson, 1994).

En general *Pleurotus* presenta un sombrero liso convexo, raramente redondo en forma de ostra o concha. Puede presentar escamas hacia el centro o en la base y los cuerpos fructíferos son por lo general concrecentes (cerca uno de otro). El píleo (casquete o sombrero) puede medir entre 5 y 12 cm de diámetro. Su color es variable, negro violáceo, pardo ceniciento, gris, amarillo, blanco o rosa según la especie. Sus laminillas son decurrentes (prolongado inferiormente del punto de inserción), anastomosadas (en forma de rama) en la base, anchas, blancas y algunas veces amarillas. El estípite (columna que soporta el píleo) es corto, excéntrico o lateral, engrosado gradualmente hacia el lado del sombrero o píleo, algunas veces no se presenta, generalmente mide alrededor de 2 cm de largo, 1 a 2 cm de grosor, es blanquecino y de contexto blanco. Las esporas son de color lila o crema en masa, de forma elipsoide con una talla promedio de 9.5 x 3.5 micras (Guzmán, 1990).

El aislamiento geográfico es uno de los factores determinantes en la separación de grupos de especies biológicas en *Pleurotus* esto crea barreras que previenen la interacción en las poblaciones y da lugar al proceso denominado especiación. Los estudios de incompatibilidad combinados con los caracteres morfológicos son determinantes para la delimitación del concepto de especie biológica. Una estrecha interacción entre caracteres morfológicos, de crecimiento, de distribución geográfica y de hospedero son determinantes para la asignación de grupos de especies en las nuevas colecciones de *Pleurotus* (Sánchez y Royse, 2001).

Con el avance tecnológico y el desarrollo de las herramientas moleculares, algunas características de los hongos como el color de la esporada por sí sola ya no es suficiente como carácter taxonómico. Un estudio integral de la sistemática del género *Pleurotus* spp. requeriría estudios de incompatibilidad y de variabilidad genética entre colecciones, porque dos colecciones pueden presentar variación (ADN *fingerprinting*), y no pueden interpretarse como especies diferentes (Sánchez y Royse, 2001).

4.1 Clasificación taxonómica de *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus (Jacq. : Fr) P. Kummer: de acuerdo a la clasificación en Index Fungorum (2023)

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotaceae

Género: *Pleurotus*

Especie: *Pleurotus ostreatus*



Figura 3.- Foto cuerpo fructífero *Pleurotus ostreatus*

Para identificar una especie es básica la descripción morfológica macroscópica ver figura 3, microscópica y fisiológica; En los hongos debe tomarse en cuenta el hábito de crecimiento, el color, tamaño, la forma del píleo y estípote (Delgado et al., 2005 y Largent 1986), el tamaño y forma de las esporas e hifas, la trama y epítutis, por mencionar sólo algunos (Largent *et al.*, 1977); otras características de índole fisiológica que pueden ser consideradas son la tasa de crecimiento micelial, temperatura óptima de crecimiento y fructificación, la productividad sobre distintos extractos y los azúcares adicionales (Sobal *et al.*, 2007).

4.2 Características macroscópicas

Presenta píleos de color muy variable, desde gris claro hasta café grisáceo oscuro, con tonalidades intermedias y reflejos azulados. Es la especie del género más citada en la literatura, y aparentemente la más conocida y cultivada en diferentes regiones del mundo, aunque el nombre ha sido utilizado y combinado con otras especies como *P. pulmonarius* (reportado como *P. ostreatus* var. *florida*) o *P. sajor-caju* (Buchanan 1993, Guzmán 2000, Shnyreva *et al.*, 2012).

4.3 Características microscópicas

Tienen esporas de forma cilíndricas a subcilíndricas, ocasionalmente elipsoides, su pared es delgada, lisa y hialina. En el himenio se han observado dos tipos de cistidios o células terminales que son estériles: pleurocistidios (sólo en el subgénero *Coremiopleurotus*) y quelocistidios, los dos de forma claviformes y de pared delgada. El trama hifal puede ser monomítico o dimítico, la trama himenófora y del píleo es irregular, Sánchez *et al.* (2017).

4.4 Caracterización molecular de *Pleurotus ostreatus* (Jacq .: Fr) P. Kummer

A pesar de la importancia de las características morfológicas, macroscópicas y microscópicas hay propuestas metodológicas que dan mayor soporte a las descripciones de las especies; a continuación, se enlistan. (Burns *et al.*, 1991).

Caracterización isoenzimática, en la que se usan los patrones de corrimiento electroforético producido por las isoenzimas que pueden diferenciar en distintos niveles taxonómicos, supra específicos (especie) o infra específicos (subespecie). (Zervakis y Labarere, 1992).

Caracterización por RFLP. Siglas en inglés de “Restriction fragment length polymorphism”. En ésta se usan endonucleasas de restricción que cortan en sitios definidos el ADN de cada especie, pueden generarse distintos patrones electroforéticos en función de su peso molecular (Sagawa *et al.*, 1992).

Caracterización por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Con el refinamiento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de Polymerase Chain Reaction) se han utilizado iniciadores (*primers*) pequeños entre 10 a 20 bases de secuencia aleatoria que pueden adherirse a un sitio del ADN y replicar secciones de éste que pueden variar en tamaño de acuerdo a la especie (Stajic *et al.*, 2005).

La caracterización de las regiones del ADN ribosomal, especialmente enfocada a la secuenciación nucleotídica de los espaciadores internos transcritos (en inglés ITS) localizados entre el rADN nuclear 18s y el 28s (Martin y Rygiewicz, 2005).

Hernández-González *et al.* (2018), determinaron las relaciones con base en las secuencias de la región ITS1-5.8-ITS2 del rDNA de 14 sepas de *Pleurotus* spp. de distintos colores, cultivadas en México. Encontrando que mediante las dos vías de análisis de las secuencias de la región ITS-1-5.8-ITS2 del DNA ribosomales obtuvieron tres conjuntos, dos de los cuales se encuentran muy cercanos y se distribuyen alrededor de dos principales especies que son *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, el tercero lo define *P. djamor*.

La cepa CMIZT-18 que se utilizó en este proyecto pertenece al conjunto de *P. ostreatus* (Hernández-González *et al.*, 2018 y Botello, 2017).

5. Aspectos nutritivos

Las setas del género *Pleurotus* son interesantes por su facilidad de cultivo, características nutritivas y medicinales como:

Proteínas, carbohidratos, fibra, vitamina A, vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina) vitamina B₃ (niacina), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₉ (ácido fólico), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D, sodio, potasio, fósforo, hierro, cobre, zinc y selenio. Además de contener distintas moléculas con propiedades antioxidantes (Sánchez y Royse, 2017).

5.1 Antioxidantes en *Pleurotus*.

Un antioxidante, es cualquier sustancia que en bajas concentraciones disminuye o previene la oxidación de un sustrato oxidable. En alimentos, los antioxidantes son útiles para inhibir la oxidación lipídica. En los organismos vivos cuando especies reactivas son generadas, muchos antioxidantes actúan para evitar que se generen cadenas de reacciones (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Un radical puede iniciar una cadena de reacciones no beneficiosas para el cuerpo humano, dejando a su paso moléculas reactivas con alta capacidad oxidante; generando en el organismo estrés oxidativo. Para compensar la situación el metabolismo celular produce antioxidantes que ayudan recobrar el equilibrio (Sánchez y Royse, 2017).

Las defensas antioxidantes tienen la capacidad de remover radicales libres de sistemas biológicos ayudando a proteger, retrasar o inhibir procesos de oxidación; pueden ser sintetizadas *in vivo* o tomadas del ambiente al incluirse en la dieta (Sánchez y Royse, 2017).

Los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* contienen antioxidantes como ergotionina, ácidos gálico y ascórbico, tocoferoles, selenio y polisacáridos con capacidad secuestradora de radicales. También se ha reportado que los compuestos fenólicos de las setas tienen capacidad antioxidante para retener radicales libres con mecanismos que inhiben enzimas responsables de producir más radicales libres (Sánchez y Royse, 2017).

Químicamente los fenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados. Su presencia en tejidos animales es debido a la ingestión de alimentos vegetales. Los fenoles sintéticos pueden incorporarse intencionalmente en la dieta para prevenir la oxidación de compuestos lipídicos (Sánchez y Royse, 2017).

La oxidación de lípidos, se puede observar en la pérdida de calidad en los alimentos; por el contrario, cuando los antioxidantes se agregan a los alimentos minimizan la acidez, retardan la formación de productos de oxidación nocivos, mantienen los nutrientes funcionales y aumentan la vida en anaquel. En células *in vivo* los procesos oxidativos juegan un papel importante en enfermedades coronarias, aterosclerosis, cáncer y el proceso de envejecimiento (Sánchez y Royse, 2017).

Respecto a la absorción y biodisponibilidad de fenoles en el cuerpo humano, se sabe en general que dependen de su metabolismo en el intestino delgado; el cual se ve influenciado por factores como: el tamaño molecular, lipibilidad, solubilidad, tiempo de tránsito intestinal, permeabilidad de membrana y el pH del lumen (Shahidi y Naczk 2004).

También se ha reportado actividad antibacteriana de los fenoles, flavonoides y β -carotenos obtenidos de extractos etanólicos de micelio de *P. ostreatus* sobre algunos patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Otra actividad de los compuestos fenólicos de *P. ostreatus* es la antiinflamatoria. (Sánchez y Royse, 2017).

Además de las características y de los usos del hongo *P. ostreatus* ya mencionadas, es importante conocer datos específicos sobre este organismo; por ejemplo, la presencia de fenoles, la cantidad de los mismos y su actividad antioxidante.

6. Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante de tres extractos hidroalcohólicos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* cultivados en paja de trigo.

6.1 Objetivos particulares

- Obtener los extractos a partir de disolventes acuoso y etanólico al 50% y 75%.
- Cuantificar fenoles totales para los tres extractos por técnica Folin Ciocalteu.
- Determinar la actividad antioxidante de los tres extractos por ensayo DPPH.

7. Antecedentes

Zaragoza (2011), reportó la presencia de compuestos fenólicos en extractos de *P. ostreatus* con efecto en la motilidad del intestino de rata y actividad antioxidante; por lo que consideró que el hongo posee propiedades nutraceuticas importantes.

Cikcikoglu et al. (2012), cuantificaron fenoles totales, y determinaron la actividad antioxidante de hongos comestibles silvestres *P. eryngii* de distintas regiones geográficas de Turquía.

De la Cruz et al. (2012), evaluaron el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de extractos hidrosolubles de cuerpo fructífero y micelio del género *Pleurotus* sp. a través de los ensayos del radical DPPH. Todos los extractos fueron capaces de reducir radicales DPPH de acuerdo a la concentración de fenoles y flavonoides encontrados.

Arbaayah y Kalsom (2013), determinaron la actividad antioxidante de *Pleurotus* spp. y *Schizophyllum commune* encontrando mayor cantidad de fenoles en *Achizophyllum commune* y mayor actividad antioxidante en *P. djamor*.

Beltrán et al. (2013), investigaron extractos de *Pleurotus* sp. con disolventes de distinta polaridad, encontrando más compuestos fenólicos en solventes de mayor polaridad como agua y etanol.

Alvarado (2015), aisló polifenoles de micelio y cuerpo fructífero de *P. djamor* (Rumph. Ex Fr.) Boejin, y determinó su actividad antioxidante por ensayo DPPH. Con un CE_{50} de $2,328 \pm 581.44$ ppm para el micelio y un CE_{50} de 769.97 ± 201.28 ppm para cuerpo fructífero.

Belloso et al. (2015), investigaron la actividad antioxidante de diez extractos acuosos y etanólicos de basidiomicetos comestibles en Guatemala por ensayo ABTS y DPPH. Determinaron en el ensayo DPPH que *P. ostreatus* fue de las especies que presentaron la menor actividad (CE_{50} 23.81 mg/mL).

Beltrán et al. (2016), cuantificaron polifenoles y la actividad antioxidante de extractos acuosos de micelio y cuerpo fructífero de *Pleurotus* sp. Encontrando mayor captación de radical DPPH en el extracto micelial.

González-Palma et al. (2016), evaluaron la actividad antioxidante de extractos acuosos y metanólicos de *P. ostreatus* en diferentes etapas de crecimiento. Encontraron en el cuerpo fructífero los mejores resultados.

Bakir et al. (2017), investigaron la actividad antioxidante de extractos de *P. ostreatus* almacenados en distintas condiciones, obteniendo mayor actividad en los extractos conservados 24 horas a temperaturas de -10°C a 20°C.

Yildiz et al. (2017), cuantificaron los fenoles totales, flavonoides, taninos y propiedades antioxidantes de *P. ostreatus* y *P. citrinopileatus* cultivados en distintos tipos de aserrín.

8. Justificación

Es importante conocer el contenido fenólico y la actividad antioxidante de *Pleurotus ostreatus*, una de las especies con mayor producción en México, gran crecimiento comercial y diversidad de usos.

9. Hipótesis

Existe diferencia en el contenido fenólico y la actividad antioxidante de tres extractos hidroalcohólicos elaborados con cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*

10. Materiales y métodos

10.1 Propagación de la cepa

Se propagó la cepa CMIZT-18 donada por el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Jardín Botánico y laboratorio de Química Biológica de la FES-Iztacala cabecera L-421, en cinco cajas Petri con agar extracto de malta durante una semana a 25°C, posteriormente se inoculó en trigo.

10.1.1 Inoculación del trigo y fructificación en paja de trigo

La semilla de trigo previamente lavada, humedecida y empaquetada en bolsas de 150 g se esterilizó durante 45 minutos en autoclave a 121°C, se dejó un día en incubadora para asegurarse de su inocuidad. Entonces, se agregó a cada bolsa de trigo un cuarto del micelio contenido en una caja Petri y se incubó a 25°C de siete a trece días para que el micelio invadiera la semilla y así se obtuvo la semilla primaria. Se volvieron a preparar bolsas con 150 g de semilla de trigo esterilizada y en lugar de utilizar micelio de una caja Petri se agregó 50 g de semilla primaria inoculada para obtener la semilla secundaria y de nueva cuenta al invadir el trigo se repitió el proceso para obtener semilla terciaria y después inocular la paja de trigo pasteurizada (Sánchez y Royse, 2001).

La paja se pasteurizó con vapor de agua en ebullición, se prepararon bolsas de 500 g, se agregaron 100 g de semilla trigo (semilla terciaria), y se dejó crecer en un ambiente sin luz durante 15 días hasta que en la paja se observaron primordios; posteriormente se hizo una abertura a la bolsa alrededor de los primordios a manera de ventanillas para dejar fructificar, a partir de este punto se revisaron regularmente las bolsas y se mantuvo húmedo el sustrato (Sánchez y Royse, 2001).

Se esperaron de 4 a 5 semanas para cosechar el cuerpo fructífero, cuando el cuerpo fructífero presentó desarrollo completo, coloración blanca y/o tonos grises; se cortó y se puso a deshidratar durante 1 día en horno a 40°C, posteriormente se pulverizó en el mortero.

10.1.2 Elaboración de extractos hidroalcohólicos

Se usó un 1 g de cuerpo fructífero seco y pulverizado en 30 mL de cada disolvente, en total fueron 3 disolventes con seis repeticiones: etanol al 50%, 75% y otro extracto solamente de agua caliente. Cada extracto fue preparado en tubos Falcon de 50 mL y puesto en agitador eléctrico durante 24 horas a 25°C, se recuperó el sobrenadante y los tubos se centrifugaron a 3,000 r.p.m. (revoluciones por minuto) durante cinco minutos en centrifuga clínica; nuevamente se recuperó el sobrenadante con el fin de purificar y perder partículas suspendidas. Los extractos se conservaron en refrigeración a -18°C.

10.2 Determinación de Fenoles totales por Folin Ciocalteu, Slinkard K. (1977)

Este método colorimétrico es usado para la medir fenoles totales en vino, té, extractos alcohólicos o metanólicos de plantas y hongos. Para estos últimos se prepararon los reactivos: ácido gálico 500 mg/L, Folin-Ciocalteu 0.2 N, carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10% y etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) al 10%.

Para la curva patrón de ácido gálico se hicieron tres repeticiones por concentración 0, 50, 100, 150, 200 y 350 mg GAE/L en tubos de ensayo de 10 mL y respectivamente 100, 90, 80, 70, 60 y 30 μL de etanol al 10% para completar 100 μL con el ácido gálico, posteriormente se agregaron 1.5 mL de Folin. (ver tabla 1).

Para los extractos se mezclaron 100 μL de cada extracto con 1.5 mL de reactivo de Folin, seis repeticiones por extracto. Todos los tubos (18 tubos de la curva patrón y 6 tubos de cada extracto) se dejaron en reposo durante 10 minutos, después se agregaron 1.2 mL de Na_2CO_3 al 10% a cada tubo y se incubaron a 40° C durante 20 minutos; finalmente se dio lectura de absorbancia a 765 nm.

Tubo / Reactivos	Ácido gálico 500 mg/L	Etanol al 10%	Follin- Ciocalteu 0.2N	Reposo 10 Minutos a temperatura ambiente	Na ₂ CO ₃ al 10%	Incubación a 40°C por 20 minutos	Lectura de absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro	Equivalentes de ácido gálico mg GAE/L
1	0 µL	100 µL	1.5 mL		1.2 mL			0
2	10 µL	90 µL	1.5 mL		1.2 mL			50
3	20 µL	80 µL	1.5 mL		1.2 mL			100
4	30 µL	70 µL	1.5 mL		1.2 mL			150
5	40 µL	60 µL	1.5 mL		1.2 mL			200
6	70 µL	30 µL	1.5 mL		1.2 mL			350

Tabla 1.- Elaboración de curva patrón de ácido gálico para Folin-Ciocalteu

10.3 Liofilización

Se liofilizaron los extractos congelados de cuerpo fructífero de *P. ostreatus* a -40 °C y MBAR 540×10^{-3} , para eliminar los solventes y obtener el peso del extracto por gramo de tejido seco. Posteriormente los extractos liofilizados se reconstituyeron con metanol puro para realizar la técnica DPPH.

10.4 Ensayo DPPH

Existen diversas técnicas de estudio para evaluar la actividad antioxidante de alimentos y plantas, el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por sus siglas en inglés DPPH ha recibido especial atención y es mayormente reportado en la literatura.

El radical libre es susceptible de reaccionar con los compuestos antioxidantes (los fenoles de los extractos) a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno por el agente antioxidante. En la reducción, el radical libre disminuye su coloración inicial dependiendo de la actividad del agente antioxidante.

10.4.1 Stock DPPH

Se disolvieron 5 mg de DPPH en 50 mL de metanol y se protegió de la luz para obtener una disolución a 100 ppm.

10.4.2 Stock de ácido gálico

Se colocaron 4 mg de ácido gálico en 10 mL metanol y se aforó hasta alcanzar un volumen de 100 mL para obtener una disolución stock de 40 µg/mL. A partir de esta disolución se obtuvieron estándares de 40, 36, 32, 28, 24, 20, 16, 12, 8 y 4 µg/mL cómo se ocuparon 50 µL de ácido gálico en 150 µL de stock de reactivo DPPH esto representó 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 y 1 µg/mL de ácido gálico en la reacción.

10.4.3 Disoluciones de extractos de *Pleurotus ostreatus*.

Se prepararon cuatro disoluciones de extracto de *P. ostreatus*: 6,000 ppm, 3,000 ppm, 1,500 ppm y 750 ppm de cada extracto para determinar la actividad antioxidante de cada uno.

10.4.4 Cuantificación

De acuerdo a lo descrito por López-Alarcón y Denicola (2013), se tomaron 200 µL de metanol con una micropipeta de 8 canales y se depositaron en la 1ª columna de una placa de Elisa; en la 2ª columna se depositaron 200 µL del stock de DPPH, de la 3ª a la 6ª columnas 150 µL del stock de DPPH y 50 µL de cada dilución de extracto. En la 3ª columna la concentración de 750 ppm, en la 4ª columna 1,500 ppm, en la 5ª columna 3,000 ppm y en la 6ª columna 6,000 ppm de extracto. Se dejó en reposo la placa por 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se hizo una placa por cada uno de los extractos, los cambios en la absorbancia de las muestras fueron leídas a 517 nm en lector de placas.

La disolución de stock de DPPH en metanol, se usó para obtener su valor de absorbancia de DPPH (blanco). La actividad antirradical se expresa como porcentaje de inhibición y se calculó usando la formula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{[\text{valor absorbancia del blanco} - \text{valor de absorbancia del extracto}]}{\text{valor absorbancia del blanco}} \times 100$$

El valor CE₅₀ se expresa en µg/mL y corresponde a la concentración de compuestos antioxidantes capaz inhibir el 50% del radical DPPH (actividad antioxidante). Se realizaron ocho repeticiones de cada determinación y se reportó la media ± la desviación estándar.

10.4.5 Análisis estadístico

Para la cuantificación de fenoles totales y la comparación del peso de los extractos liofilizados, se realizó análisis de ANOVA de un solo factor con comparación de medias (post hoc) a un alfa de 0.05 en paquetería estadística IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Statistics 2016.

11. Resultados y discusión

11.1 Determinación de Fenoles totales

Para cuantificar los fenoles totales se realizó una curva patrón de ácido gálico y se comparó la absorbancia de los extractos de cuerpo fructífero. En la figura 4 se observa la coloración azul de la reacción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu y el ácido gálico, de izquierda a derecha aumenta la concentración de ácido gálico y la saturación del color azul.



Figura 4. Curva patrón de ácido gálico.

En la gráfica de la figura 5 se observa que el valor del coeficiente de determinación (R^2) de la regresión lineal es de 0.999 lo cual indica que el modelo explica el 99% de los datos y la relación del ácido gálico con la absorbancia. Por lo que se puede determinar con confianza la cantidad de fenoles totales en los extractos.

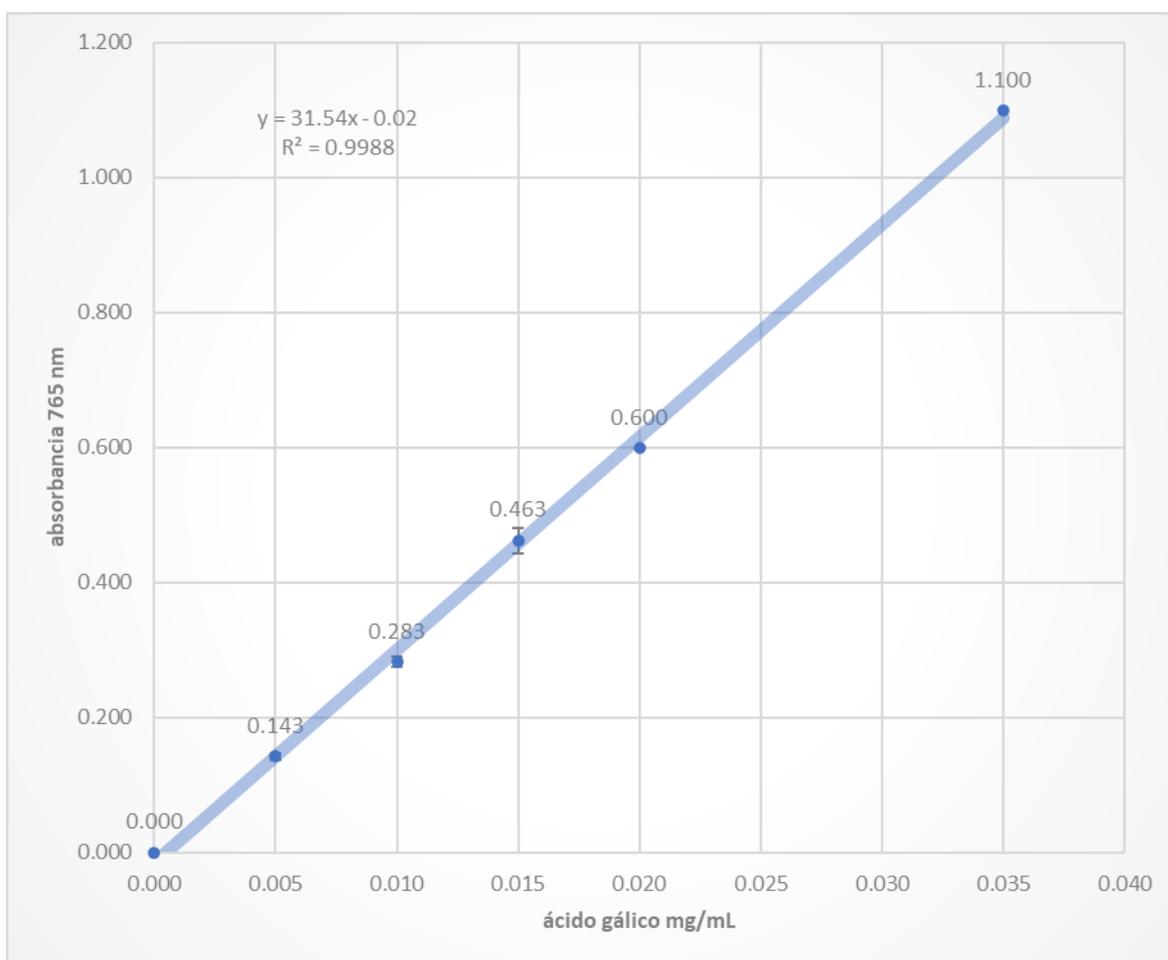


Figura 5. Gráfica de regresión lineal para curva patrón de la técnica Folin Ciocalteu (concentración de ácido gálico contra la absorbancia) cada punto representa el promedio de tres repeticiones.

Para cuantificar los fenoles totales 100 μ L de cada extracto (Figura 6), fueron mezclados con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Figura 7), y se obtuvo su absorbancia la cual se expresa en mg de equivalentes de ácido gálico en 1 g de extracto de tejido seco, como se muestra en la tabla 2.



Figura 6. Extractos de cuerpo fructífero, etanol al 75%, 50% y agua (H₂O).



Figura 7. 100 μ L de cada extracto por tubo con reactivo de Folin Ciocalteu .

Extractos	Contenido fenólico en mg GAE/g de tejido seco
Acuoso	6.08 \pm 0.77 b
Etanol al 50%	3.66 \pm 0.59 a
Etanol al 75%	3.77 \pm 0.42 a

Tabla 2. Fenoles totales expresados en mg de GAE por gramo de tejido seco (\pm) desviación estándar de cada extracto, las letras (a y b) indican diferencia significativa entre las medias.

El análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, mostró que hay diferencia significativa entre los fenoles totales del extracto acuoso con los extractos etanólicos. Aparentemente en el agua caliente es posible obtener mayor cantidad de fenoles.

Se ha estudiado que algunas moléculas no fenólicas pueden interactuar con el reactivo Folin-Ciocalteu sobreestimando la determinación de los fenoles. Muñoz-Bernal (2017), informó que algunos de los principales compuestos que pueden interferir a temperatura ambiente o incubando el extracto a 50 °C son azúcares presentes en extractos vegetales como: xilosa, fructosa y manosa.

Es posible que el contenido de azúcares en el extracto acuoso se deba su solubilidad en agua. De los azúcares vegetales reportados por Muñoz-Bernal (2017) la xilosa (azúcar de las maderas) reacciona con el reactivo de Folin-ciocalteu sobreestimando la determinación de los fenoles totales. Los pastos y las pajas contienen arabinano, galactano y xilano; Los cultivos de *Pleurotus* en paja de trigo, pulpa de café o en bagazo de caña de azúcar producen generalmente dos picos de actividad de xilanasas, el primero en etapas de colonización del sustrato y el segundo al periodo de formación de basidiomas Sánchez y Royse (2017). Por ello es probable que el extracto acuoso contenga carbohidratos.

De los antecedentes que se han mencionado los trabajos de Zaragoza (2011), Beltrán et al. (2013), Beltrán et al. (2016), Belloso et al. (2015) y González-Palma et al. (2016) a pesar de llevar metodologías distintas entre los trabajos para obtener sus extractos coinciden en que la mayor cantidad de fenoles totales fueron cuantificados en los acuosos; incluso en su metodología algunos elaboraron los extractos acuosos con agua caliente. Es probable que en estos trabajos también se haya sobreestimado la cantidad de fenoles totales.

Destaca de los anteriores González-Palma et al. (2016), por la similitud de su metodología a la del presente trabajo, porque después de cortar el cuerpo fructífero fue secado, pulverizado y mezclado con agua caliente para su elaboración, utilizando el ácido gálico para su curva patrón; cabe destacar que la cantidad de tejido seco utilizado por los autores fue de .5 gramos en 10 mililitros de solvente y que la mezcla de tejido y agua caliente se mantuvo en ebullición 5 minutos. En el presente trabajo se obtuvo mayor cantidad de fenoles: 6.08 ± 0.77 mg GAE/g de tejido seco contra 4.65 ± 0.26 que obtuvieron González-Palma et al (2016).

En los extractos hidroalcohólicos de 50% y 75% de etanol no se encontró diferencia significativa, se obtuvieron 3.66 ± 0.59 y 3.77 ± 0.42 mg GAE/g de tejido seco respectivamente y son menores que los fenoles totales obtenidos que el extracto acuoso $6.08 \pm .77$ mg GAE/g de tejido seco. De los antecedentes, los resultados de Beloso *et al.* (2015), fueron los más cercanos para poder hacer un comparativo, en donde obtuvieron 6.15 ± 1.14 mg GAE/g de tejido seco, cabe destacar que a pesar del uso de los mismos reactivos en su metodología; en el manejo del cuerpo fructífero para sus ensayos hubo diferencias ya que percoló, y utilizó rotavapor para obtener sus extractos.

Otro trabajo importante es el de González-Palma *et al.* (2016) que como ya se mencionó es metodológicamente similar al presente, salvo por el uso de metanol para hacer sus extractos no acuosos. En el obtuvieron 2.39 ± 0.02 mg GAE/g tejido seco, menor cantidad que la que se reporta en este trabajo.

Al comparar con otras especies de *Pleurotus*, podemos citar el trabajo de Alvarado (2015) que con una metodología similar a la del presente estudio obtuvo para extractos hidroalcohólicos de *P. djamor* con etanol al 55% 7.04 ± 1.2 mg GAE/g de tejido seco, lo cual es superior a los resultados obtenidos y reportados de *Pleurotus ostreatus* del presente trabajo 6.08 ± 0.77 mg GAE/g de tejido seco.

Es difícil comparar los resultados obtenidos con los trabajos de otros autores aun cuando se trate de la misma especie y variedad de *Pleurotus*, debido a las variables a considerar en todo el proceso de trabajo; pasando por la procedencia de la cepa, el sustrato de propagación, sustrato de fructificación, parte del hongo a utilizar, almacenamiento, elaboración de los extractos, técnica de laboratorio y el reactivo de control utilizado.

11.2 Peso liofilizado de extractos

La deshidratación de los extractos por medio de liofilización dejó una masa de aspecto amarillo brillante y consistencia resinosa en cada extracto. Después de realizar el análisis de varianza en el programa estadístico SPSS 2016 no se encontró ninguna diferencia significativa entre los pesos de los extractos secos se muestran los resultados en la tabla 3.

Extractos	Media de peso seco liofilizado mg/g de tejido seco
Acuoso	309.32 ± 74.4
Etanol al 50%	270.77 ± 30.9
Etanol al 75%	241.57 ± 22.2

Tabla 3. Media de peso correspondiente a 6 repeticiones ± desviación estándar de extractos liofilizados en mg/g de cuerpo fructífero seco y pulverizado, no se encontraron diferencias significativas.

11.3 Actividad antioxidante por ensayo DPPH

Para conocer la capacidad de inhibición o poder reductor de los extractos, se realizó una curva patrón con ácido gálico en partes por millón (de 1 a 10 ppm) en una placa de Elisa.

Con los resultados de la lectura se elaboró la regresión lineal que se muestra en la figura 8, en donde se puede observar que el coeficiente de determinación (R^2) de la regresión lineal es de 0.988, lo cual indica que el modelo explica el 98% de los datos y la inhibición del reactivo DPPH por el ácido gálico.

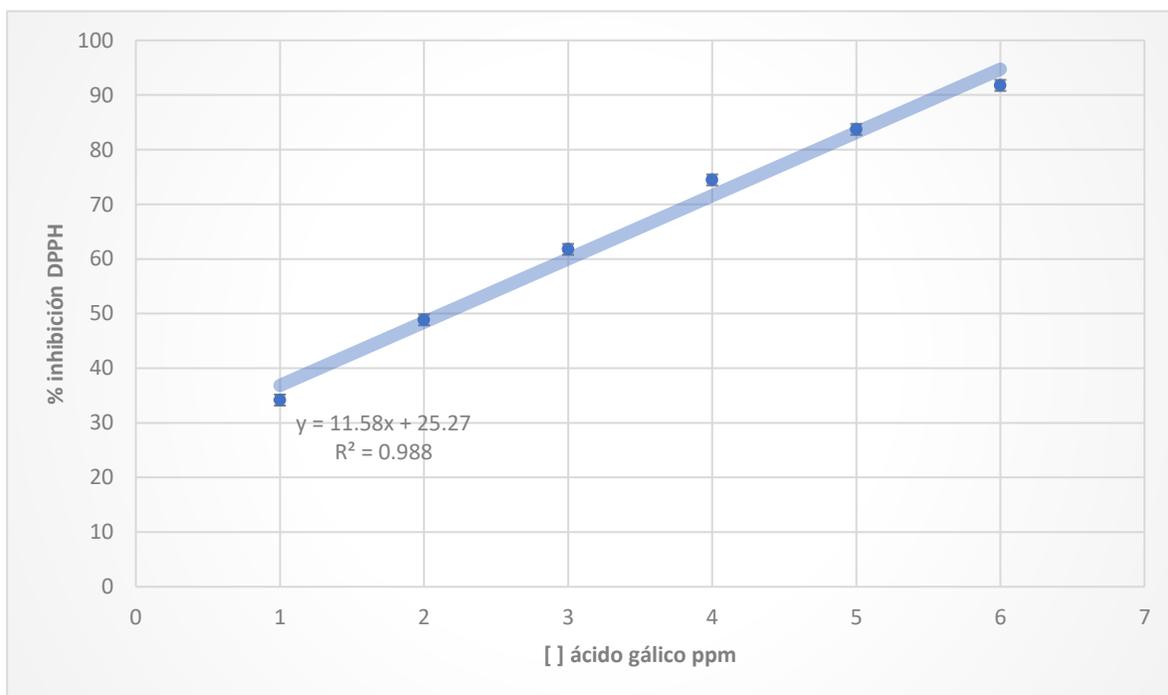


Figura 8. Regresión lineal % inhibición DPPH contra ácido gálico, cada punto representa el promedio de 8 repeticiones.

Se realizó una placa de cada extracto para conocer los porcentajes de inhibición en la reacción de reducción por medio de la lectura de absorbancia (Figura 9), y finalmente transpolar con la curva patrón el CE_{50} de cada extracto, expresado en ppm en la tabla 4.

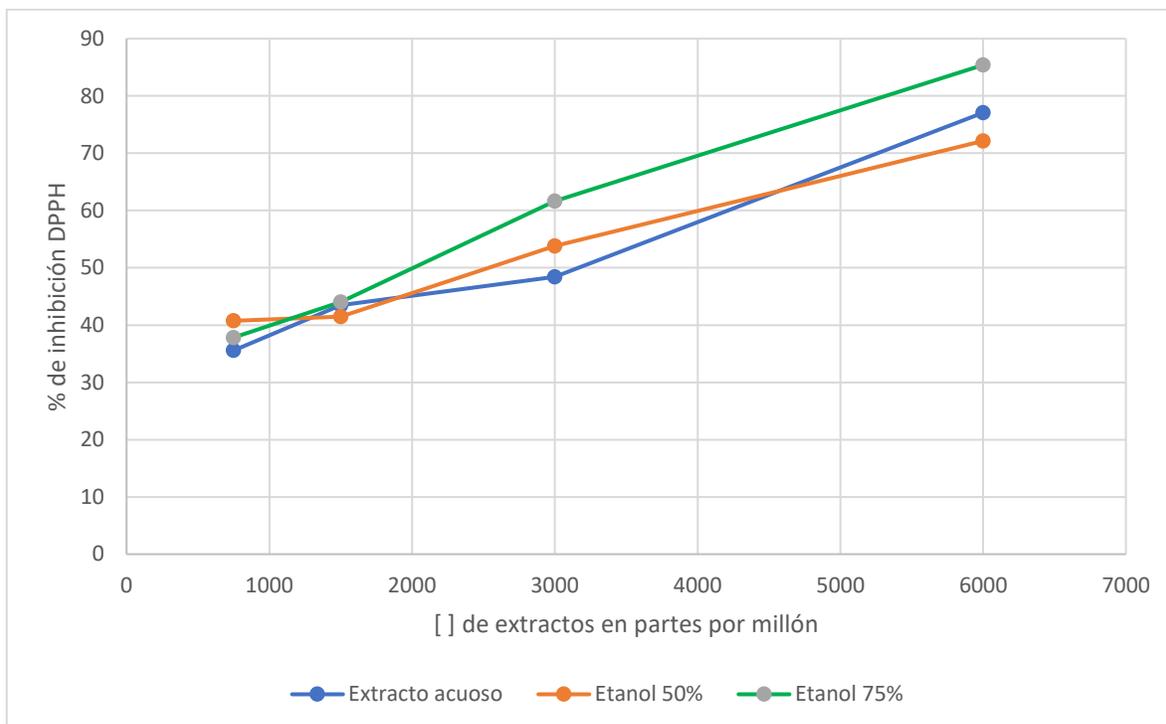


Figura 9. Actividad antioxidante de los extractos: Agua, etanol al 50% y 75%, cada punto representa el promedio obtenido de 8 repeticiones, la concentración de los extractos esta expresada en ppm ($\mu\text{g/mL}$).

Extractos	CE₅₀ expresado en ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Acuoso	2,561.50
Etanólico al 50%	2,602.00
Etanólico al 75%	2,056.55

Tabla 4. CE₅₀ capacidad efectiva media, en la reducción del radical DPPH

Los extractos analizados tuvieron actividad antioxidante, inhibición o poder reductor. El que mayor resultado obtuvo con la menor cantidad de concentración, es decir el mejor CE₅₀ fue el extracto etanólico al 75% con 2,056.55 ppm o $\mu\text{g/mL}$, seguido del extracto acuoso con 2,561.5 ppm ($\mu\text{g/mL}$) y finalmente el extracto etanólico al 50% obtuvo 2,602 ppm ($\mu\text{g/mL}$).

Aunque se obtuvieron resultados diferentes de la actividad antioxidante de los extractos, no parece ser significativa, para saberlo habría que hacer diluciones de cada extracto con la concentración para el CE₅₀ que permita hacer un análisis de la varianza.

Comparando con otros trabajos el más cercano a los resultados obtenidos en el extracto acuoso (2,561.5 ppm de CE₅₀) aunque con menor actividad fue el de Belloso et al. (2015), con un CE₅₀ de 4,790 ppm, otros autores reportan sus resultados con equivalentes de ácido gálico como González-Palma et al. (2016), quién obtuvo dos resultados utilizando para la elaboración de sus extractos agua a temperatura ambiente 775.93 mg EGA/L, y con agua caliente 36.86 mg GAE/L, los resultados de González et al. (2016) confirman la actividad antioxidante de *P. ostreatus*.

Para los extractos hidroalcohólicos al 50 y 75% se obtuvo un CE₅₀ de 2,602 y 2,056.55 ppm de extracto respectivamente, si se compara con trabajos previos que determinaron actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *P. ostreatus* se encontró, aunque con menor actividad, Belloso et al. (2015) cuyos datos fueron los más cercanos con un CE₅₀ de 19,860 ppm utilizando para la elaboración de su extracto etanol al 95%, a diferencia de Arbaayah y Kalsom (2013), que obtuvieron un CE₅₀ de 8,880 ppm usando etanol puro, cabe destacar que en su metodología Arbaayah y Kalsom, reportaron haber cortado e inmediatamente liofilizado el cuerpo fructífero antes de molerlo para hacer los extractos, tal vez estos procesos restaron actividad antioxidante. Bakir et al. (2017), profundizaron en el efecto que tiene la temperatura en la conservación del cuerpo fructífero antes de hacer el extracto, determinando que a T° <10°C se puede afectar la capacidad antioxidante.

Para determinar el CE₅₀ Bakir et al. (2017) realizaron sus extractos de *P. ostreatus* con metanol, reportaron datos en que los cuerpos fructíferos fueron almacenados 24 horas a diferentes temperaturas previas al secado, pulverización y elaboración de extracto con metanol al 80%, al realizar el ensayo obtuvieron los siguientes resultados de CE₅₀ para almacenamiento a -40°C 3,486 ppm, -20 °C 2,258 ppm, -10 °C 2,144 ppm, 4 °C 1,816 ppm y para 20 °C 321 ppm, concluyendo en su trabajo que la temperatura de almacenamiento influye en la capacidad antioxidante de los extractos.

Finalmente, se compararon los resultados de CE₅₀ de los extractos hidroalcohólicos obtenidos en este estudio (2,056.55 ppm con etanol al 75% y 2,602 ppm con etanol al 55%) contra los resultados de Alvarado (2015) obtenidos con extracto de *P. djamor* con un CE₅₀ de 769.2 ppm, resultando superior la actividad antioxidante del extracto de *P. djamor*.

Arbaayah y Kalsom (2013) encontraron 7,250 ppm como CE₅₀ para *P. djamor* pero hay que recordar que en su metodología cortaron e inmediatamente liofilizaron el cuerpo fructífero antes de secarlo y molerlo para hacer el extracto; lo anterior pudo disminuir su actividad antioxidante.

En comparación con *P. djamor* y bajo una metodología similar *P. ostreatus* tiene menor cantidad de fenoles y menor actividad antioxidante. Sin embargo, es una buena opción para degradar la paja de trigo y aprovechar los nutrientes que se obtienen para incluirlos en la dieta.

12. Conclusiones

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos se concluyó que la cantidad de fenoles totales en los extractos hidroalcohólicos de *Pleurotus ostreatus* al 50% y 75% de etanol es similar, estadísticamente no hay diferencia entre ellos; sin embargo, la prueba Folin Ciocalteu indica que el extracto elaborado con agua hirviendo, contiene una cantidad significativamente mayor de polifenoles.

La liofilización, permitió conocer el peso seco de los extractos sin mostrar diferencia estadística entre sus promedios.

Y en el ensayo DPPH la actividad antioxidante del extracto etanólico al 75% resultó ser mayor, seguida por el extracto acuoso y finalmente el extracto etanólico al 50%.

13. Recomendaciones

Existe dificultad al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de la literatura debido a que hay diferencias metodológicas en la propagación de la cepa en medio líquido o sólido, el tipo de semillas para propagar el micelio y el material del sustrato para fructificar el hongo.

Además, posterior a la cosecha de los hongos hay diversas maneras de almacenar el cuerpo fructífero, incluso se llega a utilizar crudo para hacer los extractos; otra diferencia es la parte del hongo a utilizar para elaborar el extracto: píleo, micelio o estípites lo que varía los resultados. En la determinación es importante recalcar la posible sobreestimación de fenoles totales por la presencia de azúcares en los extractos acuosos para el ensayo Folin Ciocalteu. Muñoz-Bernal (2017) reportó la importancia de tomar en cuenta los azúcares en los extractos como la xilosa y fructosa. Sugiere realizar una extracción de fase sólida previa a la cuantificación de fenoles para evitar la sobreestimación.

Por lo anterior se recomienda revisar los trabajos de González-Palma et al. (2016) y Bakir et al. (2017), con la finalidad de tratar de estandarizar un método de trabajo que permita comparar sin dificultad la información de la literatura con los resultados obtenidos.

14. Referencias bibliográficas

1. Alvarado, C. E. 2015. Evaluación del efecto del contenido nutrimental en diferentes medios de cultivo sobre la producción y contenido de polifenoles en *Pleurotus djamor* (Rumph. Ex Fr.) Boejin para determinar la actividad antioxidante. Tesis Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Arbaayah, H. H., Kalsom, U. 2013. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere* online edition. 4 (4), 661-673.
3. Bakir T., Mertcan, K., Sabri, U. 2017. Investigation of antioxidant activities of *Pleurotus ostreatus* stored at different temperatures. *Food Science & Nutrition*. Wiley. 6 :1040–1044.
4. Beltrán, D. Y., Morris, Q. H., Reynaldo, C. E., Quevedo, M. Y., Bermúdez, S. 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.
5. Beltrán D. Y., Morris, H. Q., Batista, P. L., Llauradó, G., Lebeque, Y., Bermúdez, R., García, N., Gaime, P. I., Moukha, S. P. 2016. Valor funcional y medicinal de extractos de *Pleurotus* sp. Propiedades antioxidantes. Universidad de Oriente, Centro de Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba.
6. Belloso, K., González, I., Suárez, R., Cáceres, A. 2015. Actividad antioxidante de extractos de diez basidiomicetos comestibles en Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*. 2 (2), 119-126.
7. Botello, C. 2017. Comparación de productividad de cuatro variedades del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) *P. kummer*. Tesis Licenciatura UNAM.

8. Burns, D.T., White, J.T., Taylor, W. J. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22, 525-564.
9. Buchanan, P.K. 1993. Identification, names and nomenclature of common edible mushrooms. In: Chang ST, Buswell JA, Chiu S. *Mushroom biology and mushroom products*. Chinese University Press, Hong Kong.
10. Cardona, L. 2003. Anotaciones de la conferencia: Hongos: alimento y medicina. Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. <https://es.scribd.com/document/164850278/HONGOS-ALIMENTO-Y-MEDICINA-UNIDAD1-docx>
11. Carlile, M. J., Watkinson S. 1994. *The fungi*. Academic Press, London, United Kingdom.
12. Chang, S. T. 1996. Mushroom research and development-equality and mutual benefit. In: D.J. Royse (ed). *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Proceedings of the Second International Conference, University Park, Pennsylvania State University, USA. 473-476.
13. Chegwin, A. C., 2014. Incidencia del medio y de las condiciones de cultivo en el potencial como nutriceúutico de tres especies del género *Pleurotus*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
14. Cikcikoglu, Y, N., Turkoglu, S., Yildirim, N., Kaplan, I, O. 2012. Antioxidan properties of wild edible mushroom *Pleurotus eryngii* collected from Tunceli province of turkey. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 7 (4), 1647-1654.
15. Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58 (5), 582-594.

16. Daba, A., Ezeronye, O. U. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12), 672-678.
17. De la cruz, R., Morris, H., Bautista, P., Beltrán, Y., Llauro G. 2012. Determinación de las potencialidades antioxidantes de *Pleurotus* sp. in vitro a partir de extractos hidrosolubles. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago Cuba.
18. Delgado, F.A., Villegas, R.M., Cifuentes, B.J. 2005. Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar. Facultad de Ciencias UNAM.
19. Gaitán-Hernández, R., Salmenes, D., Pérez, R., Mata, G. 2006. Manual práctico del cultivo de setas: Aislamiento, siembra y producción. Xalapa, Veracruz, México Instituto de Ecología A.C.
20. García, O. N., Bermudez, S. R. C., Augur, C., Toussos, S., Perraud-Gaime, I. 2007. Producción de lacasa extracelular, remoción de fenoles y cafeína por *Pleurotus* spp. Cultivado en pulpa de café. *Tecnología Química, Universidad de Oriente Santiago de Cuba*. 27, 83-91.
21. González-Palma, I., Escalona-Buendía, H., Ponce-Alquicira, E., Téllez-Telléz, M., Gupta, K., Díaz-Godinez, G., Soriano-Santos J. 2016. Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages. *Frontiers in Microbiology* 7, 1-9.
22. Gregori, A., Mirjan, S., Pohleven J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food technology and Biotechnology* 45 (3), 238-249.
23. Guzmán, G. 1990. Identificación de los hongos: comestibles, venenosos y alucinantes. Editorial Limusa-Noriega, México.
24. Guzmán, G. 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. *International Journal of Medical Mushrooms*. 2, 95-123.

25. Halliwell, B., Gutteridge, M. C. J. 2015. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.
26. Hernández-González, L.A., Campos, C.J.E., De la torre, A.R., Castro, F., Monsalvo, R.A. 2018. Comparación de dos regiones del r-DNA en la diferenciación de especies de *Pleurotus* sp. En: Garibay, O.R., Argüelles, M.A., Pérez, P.E. (Comps.) XII Congreso Nacional de Micología.
27. Index Fungorum. 2023. Recuperado el 30 de abril del 2023. <http://www.indexfungorum.org>
28. Jennings, D.H. 1995. The Physiology of fungal Nutrition. Cambridge University Press.
29. Largent, D., Johnson, D., Walting, R. 1977. How to identify mushrooms to genus: III: Microscopic Features. Mad River Press, Eureka.
30. Largent, D. 1986. How to identify mushrooms to genus: I Macroscopic features. Mad River Press, Eureka.
31. López-Alarcón C., Denicola, A. 2013. Evaluation the antioxidant capacity of natural products. A review on chemical and celular-based assays. *Analytica chimica Acta*.763,1-10.
32. Martin, K.J., Rygiewicz, P. 2005. Fungal-specific PCR primer developed for análisis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*. 5 (28) 1-11.
33. Martínez-Carrera, D., Larqué-Saavedra., Aliphat M., Aguilar A., Bonilla M., Martínez W. 2000. La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México. II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias.
34. Muñoz-Bernal, O. A., Torres-Aguirre G. A., Núñez-Gastélum J. A., De la Rosa L. A., Rodrigo-García J., Ayala-Zavala J. F., Álvarez-Parrilla E. 2017. Nuevo acercamiento a la Interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales, TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 20 (2), 23-28.

35. Pérez, H. 2006. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud, ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50 (3), 20-28.
36. Sagawa, I., Tanaka, M., Nagata, Y. 1992. Discrimination of Mushrooms in genus *Pleurotus* by DNA restriction fragment length polymorphism. The Journal of General Applied Microbiology. 38, 597-603.
37. Sánchez, J., D. Royse. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México: El Colegio de la Frontera Sur/ Editorial LIMUSA, S.A. de C.V.
38. Sánchez, J., Royse D. 2017. La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México: El Colegio de la Frontera Sur.
39. Setaseca. 2023. Recuperado el 30 de abril del 2023 <http://setasecas.blogspot.com/>
40. Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. 28, 49-55.
41. Shahidi, F., Naczk, M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, Florida. CRC Press LLC.
42. Shnyreva, A., Sivolapova A., Shnyreva, A. 2012. The commercially cultivated edible oyster mushrooms *Pleurotus sajor-caju* and *P. pulmonarius* are two separate species, similar in morphology but reproductively isolated. Russian Journal of Genetics. 48,1080-1088.
43. Sobal, M., Martínez-Carrera, D., Morales, P., Roussos, S. 2007. Classical caracterización of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of México. Micología Aplicada Internacional. 19, 15-23.

44. Stajic, M., Sikorki, J., Wasser, P.S., Nevo, E. 2005. Genetic similarity and taxonomic relationships within the genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) determined by RAPD analysis. *Mycotaxon*. 93, 247-255.
45. Villee, C. 1996. *Biología*. México. Mc Graw Hill Interamericana, ISBN, 9684225458, 9789684225459.
46. Wei, S., Van Griensven L. 2008. Pro- and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 10, 315-324.
47. Yıldız, S., Yılmaz A., Can Z., Kılıç C., Cafer Yıldız Ü. 2017. Total phenolic, flavonoid, tannin contents and Antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus citrinopileatus* cultivated on various sawdust. *Gida the Journal of food*. GIDA 42 (3), 315-323.
48. Zaragoza, R. 2011. Análisis de los Compuestos Fenólicos de los Hongos Comestibles Huitlacoche (*Ustilago maydis*) y Setas (*Pleurotus ostreatus*) y Evaluación de Algunas de sus Posibles Propiedades Nutracéuticas. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
49. Zervakis, G., Labarere, J. 1992. Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis patterns. *The Journal of General Applied Microbiology*. 138, 635-645.
50. Zeng, X., Suwandi J., Fuller J., Doronila A., K, Ng. 2012. Antioxidant capacity and mineral contents of edible wild Australian mushrooms. *Food Science and Technology International*. 18, 367-379.