



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

“Análisis de los Compuestos Fenólicos de los Hongos Comestibles Huitlacoche (*Ustilago maydis*) y Setas (*Pleurotus ostreatus*) y Evaluación de Algunas de sus Posibles Propiedades Nutraceuticas”.

TESIS

Que presenta

L.A.Q.B. Aldo Raúl Zaragoza Monroy

CON EL FIN DE OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS,

ÁREA: BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

COMITÉ TUTORAL:

Tutor

Dr. Fidel Guevara Lara

Asesores

M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque

Dr. Martín Gerardo Rodríguez

Aguascalientes, Ags., Mayo del 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Análisis de los Compuestos Fenólicos de los Hongos Comestibles Huitlacoche (*Ustilago maydis*) y Setas (*Pleurotus ostreatus*) y Evaluación de Algunas de sus Posibles Propiedades Nutraceuticas**", presentada por el alumno **L. A. Q. B. Aldo Raúl Zaragoza Monroy** como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., 15 de Abril del 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fidel Guevara Lara'.

Dr. Fidel Guevara Lara
Tutor del Trabajo de Tesis
Sinodal Designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de tesis "**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**", presentada por el alumno **L. A. Q. B. Aldo Raúl Zaragoza Monroy** como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., 15 de Abril del 2011

M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque
Miembro del Comité Tutorial del Trabajo de Tesis
Sinodal Designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Análisis de los Compuestos Fenólicos de los Hongos Comestibles Huitlacoche (*Ustilago maydis*) y Setas (*Pleurotus ostreatus*) y Evaluación de Algunas de sus Posibles Propiedades Nutraceuticas**", presentada por el alumno **L. A. Q. B. Aldo Raúl Zaragoza Monroy** como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., 15 de Abril del 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martín Gerardo Rodríguez'.

Dr. Martín Gerardo Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial del Trabajo de Tesis
Sinodal Designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

L.A.Q.B. ALDO RAÚL ZARAGOZA MONROY,
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Zaragoza:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Análisis de los Compuestos Fenólicos de los Hongos Comestibles Huitlacohe (*Ustilago maydis*) y Setas (*Pleurotus ostreatus*) y Evaluación de Algunas de sus Posibles Propiedades Nutraceuticas"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 17 de mayo de 2011
"SE LUMEN PROFERRE"
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ



c.c.p.- Archivo
MCGD,mjda

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, simplemente por ser mis padres, creer en mí y apoyarme en cada paso que doy sin importarles mi triunfo o fracaso, gracias.

A mis tíos Gustavo y Mari, por ser como otros padres para mí, apoyarme y guiarme desde la infancia.

A Ana, por su amor, cariño y paciencia durante todo el curso de mis estudios y siempre.

A mis primos y amigos de siempre, por su compañía, apego y hacerme reír siempre en los momentos difíciles.

Al resto de mi familia, por su compañía y apoyo.

Al Dr. Fidel Guevara Lara, por confiar en mí y haberme permitido participar en este proyecto. Además de los conocimientos y experiencias compartidas, y su apoyo como tutor.

Al M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque, por los conocimientos y experiencias compartidas, su apoyo incondicional, pero sobre todo la amistad que me ha brindado.

Al Dr. Martín Gerardo Rodríguez, por su muy valiosa colaboración y supervisión en este proyecto, la amistad brindada y los conocimientos compartidos.

Al personal de los Laboratorios de Instrumentación, Microbiología, Toxicología y Evaluación Toxicológica, por haber tenido siempre una gran atención hacia mí, y apoyarme con sus conocimientos y recursos para realizar este proyecto.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología y Funcionalidad de Alimentos, las Maestras Ma. Lorena Sandoval Cardoso y María Isabel Carrillo Díaz, por su apoyo en este proyecto y amistad.

A mis compañero y amigos de la Maestría, por su apoyo, amistad y experiencias vividas.

DEDICATORIAS

A mis Padres

Porque a ellos les debo todo lo que soy, y mis logros son de ellos también.

A mis Tíos Gustavo y Mari, y el resto de mi Familia

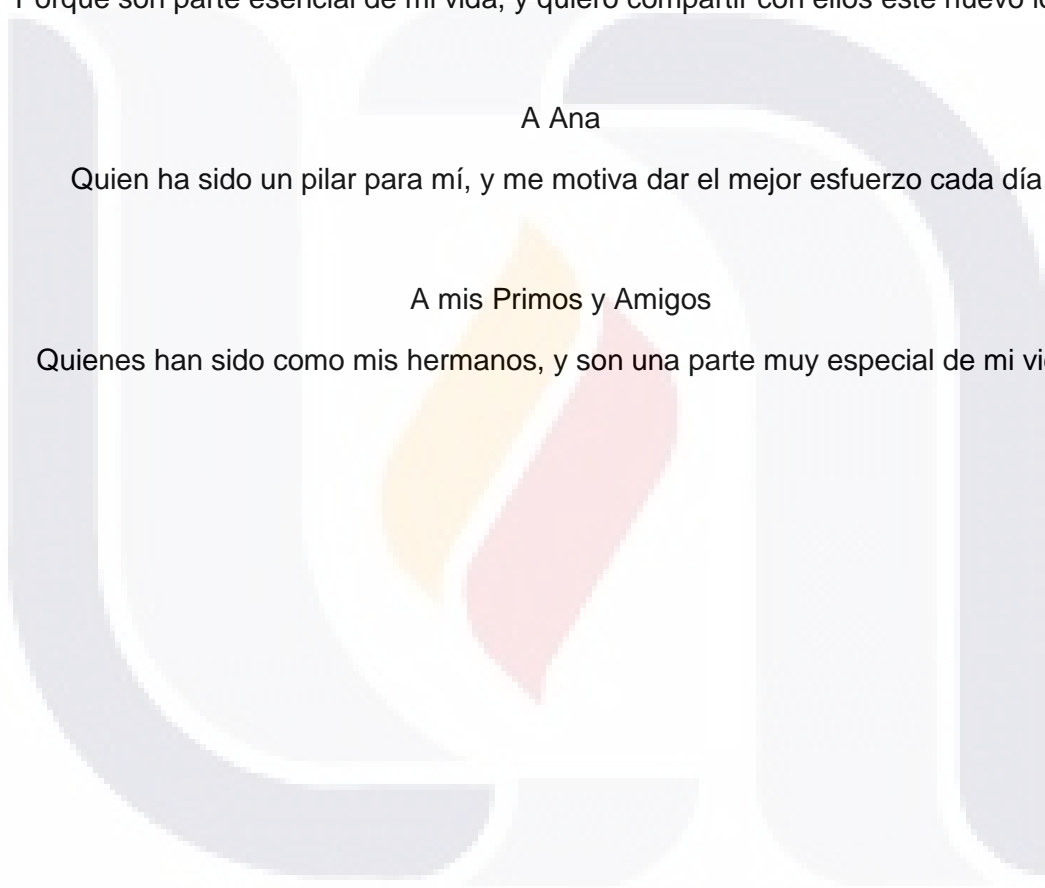
Porque son parte esencial de mi vida, y quiero compartir con ellos este nuevo logro.

A Ana

Quien ha sido un pilar para mí, y me motiva dar el mejor esfuerzo cada día.

A mis Primos y Amigos

Quienes han sido como mis hermanos, y son una parte muy especial de mi vida.



RESUMEN

Por sus atributos sensoriales y nutricionales los hongos son muy apreciados como parte de la dieta en muchas culturas. Actualmente se conocen cerca de 2,000 especies de hongos comestibles; sin embargo, muy pocos se cultivan y comercializan. Huitlacoche es el nombre que aplicaron los aztecas al cuerpo fructífero joven y comestible de *Ustilago maydis*, el cual es el agente causal del carbón común del maíz. Por otro lado, otro hongo de consumo importante en México, *Pleurotus* spp., comúnmente conocido como hongo ostra, es un desintegrador común de madera y residuos vegetales. *Pleurotus ostreatus* es el tercer hongo comestible más importante cultivado alrededor del mundo. Los hongos han sido usados por siglos tanto como alimentos y medicina principalmente en países asiáticos. Los hongos contienen una variedad de metabolitos secundarios, incluidos varios compuestos fenólicos, los cuales han demostrado actuar como excelentes antioxidantes.

Nosotros pensamos que los hongos comestibles huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* poseen compuestos fenólicos solubles e insolubles (melanina) como componentes importantes, que le confieren un valor como alimento nutraceutico; por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener extractos de compuestos fenólicos solubles de ambos hongos, así como de compuestos fenólicos insolubles (melanina) de huitlacoche, cuantificarlos y evaluar algunas de sus posibles propiedades nutraceuticas. Usando los métodos Folin-Ciocalteu, TEAC-DPPH, ORAC e inducción de motilidad intestinal en intestino aislado de rata, fueron determinados los fenoles totales, capacidad antioxidante y capacidad de inducir motilidad intestinal en los extractos antes mencionados.

El extracto de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* con mayor contenido fenólico fue el acuoso frío, con 6.8 y 7.9 mg EAG/g base seca respectivamente. En cuanto a la melanina extraída de huitlacoche, al menos el 74% de ésta se trata de compuestos fenólicos, mientras que la cantidad de compuestos fenólicos procedentes de melanina en la muestra fue de 9.1 y 9.7 mg EAG/g base seca, para la extracción 1 y 2, respectivamente. En la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH de los extractos de compuestos fenólicos solubles, el extracto acuoso frío de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* mostró los mayores niveles con 7.1 y 2.1 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente. En el caso de la melanina extraída de huitlacoche, la capacidad antioxidante (TEAC-DPPH) procedente de melanina en la muestra fue de 7.3 y 8.8 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca, para la extracción 1 y 2, respectivamente. También se logró cuantificar

compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en los residuos de la extracción de melanina, encontrando niveles muy altos en algunos de ellos, sugiriendo grandes pérdidas durante el proceso de extracción. En cuanto a la capacidad antioxidante por ORAC de los extractos de compuestos fenólicos solubles, los mayores niveles en huitlacoche fueron mostrados por el extracto etanólico con 136.1 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca, y en *Pleurotus ostreatus* por el extracto acuoso frío con 109.4 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca. Los valores de capacidad antioxidante por ORAC en la melanina extraída de huitlacoche fueron muy variables, no obstante se determinó que la melanina posee capacidad antioxidante por este método. Por otro lado, se determinó que los extractos saturados (50 mg/mL) de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* tienen efectos sobre la motilidad del intestino de rata aislado, sobre todo en la tensión media de la contracción; los mayores efectos en huitlacoche fueron mostrados por los extractos etanólico y acuoso caliente, mientras que en *Pleurotus ostreatus* los mayores efectos fueron mostrados por los extractos acuosos caliente y frío. El extracto acuoso caliente de *Pleurotus ostreatus* mostró efectos estadísticamente iguales que el neurotransmisor acetilcolina (1×10^{-6} M). La melanina extraída de huitlacoche no mostró efectos sobre la motilidad del intestino de rata aislado al usarse en forma de suspensión.

La presencia de compuestos fenólicos en todos los extractos, la actividad antioxidante, y los efectos sobre la motilidad del intestino de rata, sugieren que el huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* poseen propiedades nutraceuticas importantes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARTAS DE LIBERACIÓN	i
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
RESUMEN	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA	4
2. 1. Alimentos Nutracéuticos	4
2. 2. ¿Qué es un Hongo?	5
2. 3. Los Hongos en la Tecnología de Alimentos	6
2. 3. 1. Introducción	6
2. 3. 2. Biotecnología Fúngica en la Producción de Alimentos	6
2. 3. 3. Producción de Hongos Comestibles	7
2. 3. 4. Producción Mundial de Hongos	9
2. 4. Función Alimenticia y Medicinal de los Hongos	10
2. 4. 1. Introducción	10
2. 4. 2. Funciones Dietarias de Hongos	10
2. 4. 2. 1. Características nutricionales (función primaria)	10
2. 4. 2. 2. Características de preferencia (función secundaria)	11
2. 4. 2. 3. Características fisiológicas (función terciaria)	12
2. 4. 3. Hongos con Actividad Farmacológica	13
2. 4. 3. 1. Introducción	13
2. 4. 3. 2. Hongos antibacteriales y antifúngicos	13
2. 4. 3. 3. Actividad contra bacterias multirresistentes	13

2. 4. 3. 4. Actividades antimicrobianas de compuestos conocidos	13
2. 4. 3. 5. Hongos antivirales	14
2. 4. 3. 6. Hongos antitumorales	14
2. 4. 3. 7. Inmunomoduladores de hongos y adyuvantes en la terapia antitumoral	15
2. 4. 3. 8. Hongos inmunosupresivos y antialérgicos	16
2. 4. 3. 9. Hongos antiaterogénicos	17
2. 4. 3. 10. Hongos hipoglucemiantes	17
2. 4. 3. 11. Hongos antiinflamatorios	18
2. 4. 3. 12. Hongos hepatoprotectivos	18
2. 4. 3. 13. Hongos con actividades centrales	19
2. 4. 3. 14. Perspectivas	19
2. 5. Huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>)	20
2. 5. 1. Introducción	20
2. 5. 2. Propiedades Alimentarias y Nutracéuticas del Huitlacoche	21
2. 5. 2. 1. Proteínas y aminoácidos	21
2. 5. 2. 2. Grasas, carbohidratos y fibra	22
2. 5. 2. 3. Sustancias involucradas en el sabor	22
2. 5. 2. 4. Propiedades nutracéuticas	22
2. 6. Hongo Ostra o Setas Comestibles (<i>Pleurotus</i> spp.)	23
2. 6. 1. <i>Pleurotus</i> spp.	23
2. 6. 2. <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
2. 6. 3. Propiedades Farmacológicas de Hongos del Género <i>Pleurotus</i>	24
2. 7. Compuestos Fenólicos en Alimentos y Nutracéuticos	26
2. 7. 1. Compuestos Fenólicos en Hongos	26
2. 8. Melaninas	28
2. 8. 1. Propiedades Funcionales y Bioactivas de las Melaninas	30

2. 9. Métodos Analíticos para la Evaluación de Compuestos Fenólicos Totales y Capacidad Antioxidante	32
2. 9. 1. Compuestos Fenólicos Totales por Folin-Ciocalteu	33
2. 9. 2. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox con el Radical DPPH (TEAC-DPPH)	34
2. 9. 3. Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)	35
3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	37
4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO	37
5. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	38
5. 1. Objetivo General	38
5. 2. Objetivos Particulares	38
6. METAS	38
7. METODOLOGÍA	39
7. 1. Obtención de las Muestras de Huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>) y Setas (<i>Pleurotus ostreatus</i>) Comestibles	39
7. 2. Preparación de las Muestras para Análisis Posteriores	41
7. 3. Obtención de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles	41
7. 3. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	41
7. 3. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	42
7. 4. Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales	45
7. 4. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	45
7. 4. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	45
7. 5. Evaluación de las Propiedades Nutracéuticas de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles	47
7. 5. 1. Medición de la Capacidad Antioxidante Mediante la Reducción de Radicales Libres (TEAC-DPPH)	47
7. 5. 1. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	47
7. 5. 1. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	48

7. 5. 2. Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i> por el Método ORAC	49
7. 5. 2. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	49
7. 5. 2. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	51
7. 5. 3. Medición de la Capacidad de los Extractos de Inducir Motilidad Intestinal	51
7. 5. 3. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	51
7. 5. 3. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	52
8. RESULTADOS	53
8. 1. Obtención de las Muestras de Huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>) y Setas (<i>Pleurotus ostreatus</i>) Comestibles	53
8. 2. Preparación de las Muestras para Análisis Posteriores	54
8. 3. Obtención de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles	56
8. 3. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	56
8. 3. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	58
8. 4. Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales	61
8. 4. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	61
8. 4. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	62
8. 5. Evaluación de las Propiedades Nutracéuticas de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles	67
8. 5. 1. Medición de la Capacidad Antioxidante Mediante la Reducción de Radicales Libres (TEAC-DPPH)	67
8. 5. 1. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	67
8. 5. 1. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	68
8. 5. 2. Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i> por el Método ORAC	72
8. 5. 2. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	72
8. 5. 2. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	73
8. 5. 3. Medición de la Capacidad de los Extractos de Inducir Motilidad Intestinal	75
8. 5. 3. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	75
8. 5. 3. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	81

9. DISCUSIONES	82
9. 1. Obtención de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles	82
9. 1. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	82
9. 1. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	84
9. 2. Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales	86
9. 2. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	86
9. 2. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	89
9. 3. Evaluación de las Propiedades Nutraceuticas de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles	92
9. 3. 1. Medición de la Capacidad Antioxidante Mediante la Reducción de Radicales Libres (TEAC-DPPH)	92
9. 3. 1. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	92
9. 3. 1. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	95
9. 3. 2. Determinación de la Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i> por el Método ORAC	98
9. 3. 2. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	98
9. 3. 2. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	101
9. 3. 3. Medición de la Capacidad de los Extractos de Inducir Motilidad Intestinal	103
9. 3. 3. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles	103
9. 3. 3. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles	108
10. CONCLUSIONES	109
11. APÉNDICE	111
11. 1. Análisis Estadístico del Rendimiento de Extracción en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	111
11. 2. Curvas de Calibración y Análisis Estadístico en la Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales	111
11. 2. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	111
11. 2. 1. 1. Curvas de calibración	111
11. 2. 1. 2. Análisis estadístico	113

11. 2. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	113
11. 2. 2. 1. Curvas de calibración	113
11. 2. 2. 2. Análisis estadístico	114
11. 3. Curvas de Calibración y Análisis Estadístico en la Medición de Capacidad Antioxidante por el Método TEAC-DPPH	116
11. 3. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	116
11. 3. 1. 1. Curvas de calibración	116
11. 3. 1. 2. Análisis estadístico	118
11. 3. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	118
11. 3. 2. 1. Curvas de calibración	118
11. 3. 2. 2. Análisis estadístico	119
11. 4. Curvas de Calibración y Análisis Estadístico en la Medición de Capacidad Antioxidante por el Método ORAC	120
11. 4. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	120
11. 4. 1. 1. Curvas de calibración	120
11. 4. 1. 2. Análisis estadístico	121
11. 4. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles	121
11. 4. 2. 1. Curvas de calibración	121
11. 4. 2. 2. Análisis estadístico	121
11. 5. Análisis Estadístico de la Inducción de Motilidad Intestinal	122
11. 5. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles	122
11. 5. 1. 1. Extractos de huitlacoche	122
11. 5. 1. 2. Extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i>	123
11. 5. 2. Acetilcolina	124
11. 5. 3. Comparación entre el Efecto del Extracto, Acetilcolina y Tensión Basal	124
12. GLOSARIO	125
13. BIBLIOGRAFÍA	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestras de huitlacoche de origen comercial	53
Figura 2. Proceso de producción de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i>	53
Figura 3. Cuerpos fructíferos cosechados de <i>Pleurotus ostreatus</i>	54
Figura 4. Liofilizadoras usadas para la deshidratación de las muestras	55
Figura 5. Muestras de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i> liofilizadas y trituradas	55
Figura 6. Proceso de obtención de extractos etanólicos, metanólicos y acuosos fríos de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	56
Figura 7. Proceso de obtención de los extractos acuosos calientes de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	57
Figura 8. Algunos de los extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos	57
Figura 9. Rendimiento de extracción en extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	58
Figura 10. Extracción de melanina de huitlacoche: digestión alcalina	59
Figura 11. Extracción de melanina de huitlacoche: hidrólisis ácida	60
Figura 12. Extracción de melanina de huitlacoche: lavados con cloroformo	60
Figura 13. Melanina purificada	61
Figura 14. Fenoles solubles totales en extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	62
Figura 15. Fenoles totales en melanina soluble	64
Figura 16. Fenoles totales en la melanina extraída	65
Figura 17. Fenoles totales procedentes de melanina en la muestra	65
Figura 18. Fenoles totales en residuos de la extracción de melanina	67
Figura 19. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox en extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	68
Figura 20. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox en melanina	69
Figura 21. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox procedente de melanina en la muestra	70

Figura 22. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox en residuos de extracción de melanina	71
Figura 23. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox en extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i> (método ORAC)	73
Figura 24. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox en melanina (método ORAC)	74
Figura 25. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox procedente de melanina en la muestra (método ORAC)	74
Figura 26. Efecto de los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche sobre la movilidad del intestino de rata	76
Figura 27. Efecto de los extractos de compuestos fenólicos solubles de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre la movilidad del intestino de rata	77
Figura 28. Efecto del control de acetilcolina sobre la movilidad del intestino de rata	78
Figura 29. Comparación entre el efecto del extracto (0.5 mg/mL), control de Ach y tensión basal	79
Figura 30. Comparación entre el efecto del extracto (5 mg/mL), control de Ach y tensión basal	80
Figura 31. Comparación entre el efecto del extracto (50 mg/mL), control de Ach y tensión basal	80
Figura 32. Curva de calibración para calcular el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos etanólicos de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i> (ácido gálico en etanol 95%)	112
Figura 33. Curva de calibración para calcular el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos metanólicos de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i> (ácido gálico en metanol 95%)	112
Figura 34. Curva de calibración para calcular el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos acuosos fríos y calientes de huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i> (ácido gálico en agua destilada)	113
Figura 35. Curva de calibración para calcular el contenido de compuestos fenólicos totales en melanina (ácido gálico en KOH 2 M)	114
Figura 36. Curva de calibración para calcular el contenido de compuestos fenólicos totales en residuos de la extracción de melanina (ácido gálico en KOH 2 M)	114

- Figura 37.** Curva de calibración para calcular la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en extractos etanólicos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (Trolox en etanol 95%) 116
- Figura 38.** Curva de calibración para calcular la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en extractos metanólicos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (Trolox en metanol 95%) 117
- Figura 39.** Curva de calibración para calcular la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en extractos acuosos fríos y calientes de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (Trolox en agua destilada) 117
- Figura 40.** Curva de calibración para calcular la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en melanina (Trolox en metanol absoluto) 118
- Figura 41.** Curva de calibración para calcular la capacidad antioxidante por TEAC- DPPH en residuos de la extracción de melanina (Trolox en metanol absoluto) 119
- Figura 42.** Curva de calibración para calcular la capacidad antioxidante por ORAC en melanina y extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (curva de calibración ORAC) 120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores Dietarios Ligados a Enfermedades	4
Tabla 2. Especies Fúngicas Representativas en la Biotecnología de Alimentos	7
Tabla 3. Compuestos que Intervienen en el Sabor del Huitlacoche	22
Tabla 4. Composición Nutricional del Hongo <i>P. ostreatus</i>	24
Tabla 5. Porcentaje de Humedad en Huitlacoche Liofilizado	55
Tabla 6. Porcentaje de Humedad en <i>P. ostreatus</i> Liofilizado	56
Tabla 7. Rendimiento de Extracción en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>P. ostreatus</i>	58
Tabla 8. Balance de la Extracción de Melanina	61
Tabla 9. Fenoles Solubles Totales en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>P. ostreatus</i>	62
Tabla 10. Balance de la Preparación de las Soluciones Alcalinas de Melanina	63
Tabla 11. Fenoles Totales en Melanina	64
Tabla 12. Fenoles Totales en Residuos de la Extracción de Melanina	66
Tabla 13. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>P. ostreatus</i>	68
Tabla 14. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox en Melanina	69
Tabla 15. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox en Residuos de la Extracción de Melanina	71
Tabla 16. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox por Método ORAC en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>P. ostreatus</i>	72
Tabla 17. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox por Método ORAC en Melanina	73
Tabla 18. Tensión Media de la Contracción (gf) Bajo Estímulo de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche	75
Tabla 19. Tensión Media de la Contracción (gf) Bajo Estímulo de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de <i>P. ostreatus</i>	76
Tabla 20. Tensión Media de la Contracción (gf) Bajo Estímulo del Control de Acetilcolina	77

Tabla 21. Comparación Entre el Efecto del Extracto, Control de Acetilcolina y Tensión Basal (gf)	78
Tabla 22. Rendimiento (%) de Extracción de Melanina en Literatura	85
Tabla 23. Análisis de Varianza del Rendimiento de Extracción en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	111
Tabla 24. Análisis de Varianza de Compuestos Fenólicos Totales en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	113
Tabla 25. Análisis de Varianza de Compuestos Fenólicos Totales por Miligramo de Melanina Soluble	114
Tabla 26. Prueba T-pareada para Compuestos Fenólicos Totales por Miligramo de Melanina Extraída	115
Tabla 27. Prueba T-pareada para Compuestos Fenólicos Totales Procedentes de Melanina en la Muestra	115
Tabla 28. Análisis de Varianza de Compuestos Fenólicos Totales en Residuos de la Extracción de Melanina	115
Tabla 29. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante TEAC-DPPH en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	118
Tabla 30. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante TEAC-DPPH por Miligramo de Melanina	119
Tabla 31. Prueba T-pareada para Capacidad Antioxidante TEAC-DPPH Procedente de Melanina en la Muestra	119
Tabla 32. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante TEAC-DPPH en Residuos de la Extracción de Melanina	120
Tabla 33. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante ORAC en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>	121
Tabla 34. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante ORAC por Miligramo de Melanina	121
Tabla 35. Prueba T-pareada para Capacidad Antioxidante ORAC Procedente de Melanina en la Muestra	121
Tabla 36. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Etanólico de Huitlacoche	122
Tabla 37. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Metanólico de Huitlacoche	122

Tabla 38. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Frío de Huitlacoche	122
Tabla 39. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Caliente de Huitlacoche	122
Tabla 40. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Etanólico de <i>Pleurotus ostreatus</i>	123
Tabla 41. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Metanólico de <i>Pleurotus ostreatus</i>	123
Tabla 42. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Frío de <i>Pleurotus ostreatus</i>	123
Tabla 43. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Caliente de <i>Pleurotus ostreatus</i>	123
Tabla 44. Prueba T-pareada para Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de Acetilcolina (1×10^{-6} M)	124
Tabla 45. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de los Extractos de Ambos Hongos (0.5 mg/mL), Acetilcolina y Tensión Basal	124
Tabla 46. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de los Extractos de Ambos Hongos (5.0 mg/mL), Acetilcolina y Tensión Basal	124
Tabla 47. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de los Extractos de Ambos Hongos (50.0 mg/mL), Acetilcolina y Tensión Basal	124

1. INTRODUCCIÓN

Las creencias culturales en los poderes místicos de los alimentos han estado pasando por generaciones. La capacidad de alimentos específicos para prevenir o reducir la severidad de síntomas de insuficiencias nutricionales ha sido reportada en una variedad de documentos históricos. Interesantemente, cuando los científicos desentrañaron los misterios acerca de las necesidades nutricionales específicas, esto vino a dar que evidentemente algunos componentes dietarios que pudieran no ser requeridos para la existencia humana pueden en efecto influir marcadamente en la calidad de vida por la modificación de uno o más procesos fisiológicos. La capacidad de tales alimentos para influir estos procesos es probablemente dependiente de varios factores, incluyendo interacciones con otros constituyentes en el total de la dieta y del estado fisiológico del consumidor, patrón de comportamiento, y trasfondo genético. La gente en la totalidad del mundo está convenciéndose fuertemente de que los alimentos que consumen pueden no sólo actuar modulando sino que además pueden influir sobre el riesgo de adquirir una variedad de enfermedades. Esto hace lógico asumir que la demanda del consumidor por estos alimentos que promueven la salud y los compuestos fisiológicamente activos que ellos contienen continuará creciendo en un futuro próximo, así como también la disponibilidad de nuevos alimentos **(Milner, 2000)**.

Por sus atributos sensoriales y nutricionales los hongos son muy apreciados como parte de la dieta en muchas culturas. Actualmente se conocen cerca de 2,000 especies de hongos comestibles; sin embargo, muy pocos se cultivan y comercializan **(Paredes y Valverde, 2006)**. Los hongos son recurso de alimentos fisiológicamente funcionales y pueden además ser usados como materiales para el desarrollo de medicinas benéficas y no invasivas. A pesar de su bajo valor nutricional (función primaria de alimento), tienen sabor, características de preferencia (función secundaria), y varias características fisiológicas (función terciaria). Además, los hongos, como también las formas de plantas superiores, son un recurso de conjuntos de genes los cuales son invaluable para los seres humanos **(Mizuno, 1995)**.

Huitlacoche es el nombre que aplicaron los aztecas al cuerpo fructífero joven y comestible de *Ustilago maydis*, el cual es el agente causal del carbón común del maíz. Esta enfermedad es caracterizada por la presencia de agallas en varias partes aéreas de las

plantas, incluyendo tallos, hojas, borlas y espigas. Las espigas pueden ser completamente cubiertas por las agallas.

El huitlacoche es un basidiomiceto del orden de los Ustilaginales; algunas características de éstos son las siguientes:

- Infectan estructuras reproductivas de las plantas, principalmente flores.
- El desarrollo del micelio no es profuso.
- El promicelio está septado transversalmente, con basidiosporas laterales y terminales.

Pertenece al género *Ustilago*, cuyas especies:

- Tienen soros con apariencia de hollín y vagamente lleno con teliosporas negras o café oscuro.

Y la especie *maydis*, nos habla del que es un parásito específico del maíz (**Valverde y col., 1995**).

Las agallas producidas por el hongo *Ustilago maydis* en las mazorcas de maíz se conocen como huitlacoche o cuitlacoche y en México se consume desde la época prehispánica. Generalmente se recolecta y vende en estado fresco y envasado, y se le considera una exquisitez culinaria.

La popularidad del huitlacoche como comida típica nuestra ha rebasado las fronteras de México y su presencia en el mundo es cada vez más visible. Recientemente la demanda de este exquisito hongo ha aumentado considerablemente y se ha introducido a los Estados Unidos, donde se le han asignado diferentes nombres como caviar azteca y trufa mexicana, y se lo ha aplaudido en revistas como *Play Boy*, *Vogue* y otras (**Paredes y Valverde, 2006**).

El valor dado a los alimentos está basado ampliamente en su composición química. El huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas minerales y vitaminas, que contribuyen a este valor nutricional. Así, considerando esta composición química, el huitlacoche es de muy especial interés en el consumo humano (**Valverde y col., 1995**).

El huitlacoche, como alimento típico mexicano, debe su creciente popularidad a su característico sabor, que no se parece a ningún otro alimento conocido. En este sentido podemos hablar de sabor de huitlacoche, de igual manera que nos referimos a chocolate, fresa, vainilla, etc.; como sabores clásicos. Existen ciertos compuestos que intervienen en el sabor de diferentes hongos. Sin embargo, algunos compuestos sólo están presentes en el huitlacoche y no en ningún otro hongo.

También se han identificado compuestos fenólicos en altas concentraciones, las cuales poseen propiedades antioxidantes y antimutagénicas que son muy útiles para prevenir enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis, y por lo tanto se puede incluir en lo que se conoce actualmente como alimentos nutraceuticos **(Beas-Fernández y col., 2008; Beas-Fernández y col., 2006; Paredes y col., 2006)**.

Por otro lado, otro hongo de consumo importante en México, *Pleurotus* spp., comúnmente conocido como hongo ostra, es un descomponedor primario común de madera y residuos vegetales. Éste puede ser encontrado naturalmente en bosques lluviosos tropicales y subtropicales, y puede ser cultivado. Apreciado debido a su delicioso sabor, este hongo tiene altas cantidades de proteínas, carbohidratos, minerales (calcio, fósforo, hierro) y vitaminas (tiamina, riboflavina y niacina) así como también poca grasa.

Por muchas razones los hongos del género *Pleurotus* han sido estudiados intensivamente en muchas diferentes partes del mundo: tienen alto valor gastronómico, son capaces de colonizar y degradar una gran variedad de residuos lignocelulósicos, requieren poco tiempo de crecimiento cuando se comparan con otros hongos comestibles, demandan pocos controles ambientales, sus cuerpos fructíferos no son muy comúnmente atacados por enfermedades y plagas y pueden ser cultivados de una forma simple y barata **(Bonatti y col., 2004)**.

Los hongos del género *Pleurotus* han sido estudiados minuciosamente en cuanto su valor nutricional y componentes de sabor. Recientemente, estos hongos comerciales se encontró que son medicamente activos en varias terapias tales como antitumorales, antivirales, e inmunomodulatorias. Aunque si bien la investigación se concentró en los efectos terapéuticos de estos hongos, existe poca información disponible acerca de sus propiedades antioxidantes **(Yang y col., 2002)**.

2. MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA

2. 1. Alimentos Nutraceuticos

Nutraceutico es un término acuñado en 1979 por Stephen DeFelice. De acuerdo a DeFelice, éste es definido “como un alimento o partes de alimento, que proporciona beneficios a la salud o médicos, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades”. Subsecuentemente, varios otros términos (alimento médico, alimento funcional, suplemento nutricional) fueron usados (Krämer y col., 2001).

Nutraceutico puede abarcar nutrientes aislados, suplementos dietarios, y alimentos diseñados por ingeniería genética, productos herbales, y productos procesados, tales como cereales, sopas y bebidas. Este creciente interés en los nutraceuticos refleja el hecho de que los consumidores escuchan acerca de los estudios epidemiológicos indicando que una dieta específica o componente de la dieta está asociado con un bajo riesgo para cierta enfermedad (Krämer y col., 2001).

	Grasa total o saturada	Antioxidantes	Ácido fólico	Calcio	Complejos carbohidratos, fibra	Ácidos grasos omega-3
Enfermedad cardiovascular	-	+	+	+	+	+
Cáncer	-	+	+	+	+	+
Diabetes	-	+			+	+
Catarata/AMD	-	+				
Obesidad	-				+	
Osteoporosis				+		
Consecuencias de nacimiento		+	+		+	+
Función inmune	-	+	+		+	+

+ = Impacto positivo sobre la salud; - = Impacto negativo sobre la salud; AMD = degeneración macular relacionada con la edad.

Los compuestos que han sido estudiados más extensivamente son los antioxidantes. Muchos beneficios potenciales han sido atribuidos a los antioxidantes en la forma de consumo dietario o suplementación. Los antioxidantes en general pueden ser útiles en la prevención del cáncer y enfermedades cerebrovasculares (Krämer y col., 2001).

Un consumo alto de antioxidantes es asociado con un bajo riesgo de cáncer, enfermedad coronaria del corazón, y otras enfermedades degenerativas. Sin embargo, debe hacerse notar que mientras exista la correlación entre el alto consumo de nutrientes y

enfermedades específicas, la respuesta de cualquier individuo dado es completamente variable. Estas variaciones individuales en las respuestas dietarias son probablemente debidas a la diferente composición genética de cada individuo. Numerosos factores genéticos están involucrados en determinar la respuesta hacia nutrientes dietarios específicos. Estos incluyen genes importantes para la absorción de nutrientes así como también genes importantes para el metabolismo y procesamiento de los nutrientes en la dieta. Adicionalmente, la cantidad de cada nutriente en la dieta también tiene un impacto en el nivel de expresión de un gen específico. Tales mecanismos regulatorios pueden además explicar las diferencias individuales en la susceptibilidad para enfermedades inducidas por la dieta **(Krämer y col., 2001)**.

Las tecnologías revolucionarias – incluyendo la biotecnología – han creado una nueva era en la cual los descubrimientos nutricionales, productos innovadores, y la producción en masa son posibles como nunca antes. Estos desarrollos médicos y científicos han producido una importante y explosiva nueva era de investigación, resultando en un alto número de productos nutricionales potenciales con beneficios a la salud y médicos **(Krämer y col., 2001)**.

2. 2. ¿Qué es un Hongo?

El término “hongo” es popularmente usado para nombrar a los organismos macrofúngicos con su distintivo cuerpo fructífero, el cual puede ser hipogeo o epigeo, lo suficientemente grande para ser visto a simple vista y ser tomado por una mano. Sin embargo, el término “hongo” incluye a muchas más especies además de los macromicetos. Desde el punto de vista taxonómico, principalmente los Basidiomycetes (basidiomicetos) pero también algunas especies de Ascomycetes (ascomicetos) pertenecen a los así llamados “hongos” (macromicetos). El Reino Myceteae (Fungi) está constituido por al menos 14,000 especies (y tal vez hasta 22,000 especies) conocidas. El número de especies de hongos sobre la Tierra se estima que sean 140,000 sugiriendo que sólo 10% son conocidos. Asumiendo que la proporción de hongos útiles entre los aún no descubiertos y no examinados fuera de sólo el 5%, esto implicaría 7,000 especies aún no descubiertas que serían de posible beneficio para la humanidad. Incluso entre las especies conocidas la proporción de hongos bien investigados es muy baja. Este hecho, junto con el conocimiento acerca del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

gran potencial de los hongos microscópicos para la producción de metabolitos bioactivos [p. ejem. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Tolyptocladium inflatum* W. Gams, *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.], la experiencia en el uso etnomedicinal de los hongos, la necesidad ecológica de hongos que produzcan metabolitos secundarios bioactivos y el mejoramiento de las posibilidades genéticas, farmacológicas y análisis químico, nos permitiría asumir que los hongos tienen gran potencial para un bioprospecto satisfactorio **(Lindequist y col., 2001)**.

2. 3. Los Hongos en la Tecnología de Alimentos

2. 3. 1. Introducción

Los conceptos y aplicaciones prácticas de la biotecnología fúngica continúan haciendo contribuciones significativas a la ciencia de los alimentos. Sin excepción muchos aspectos de los ingredientes de los alimentos y procesos tecnológicos involucrando hongos son impactados por la investigación en biotecnología, por ejemplo, alimentos funcionales, nutracéuticos, alimentos de valor agregado, y patógenos de alimentos y sistemas de detección seguros **(Arora, 2004)**.

2. 3. 2. Biotecnología Fúngica en la Producción de Alimentos

No importa lo anecdótico de la evidencia, incluso las sociedades antiguas reconocían el uso de la tecnología fúngica, en relación con su agricultura y alimento. El conocimiento de la diversidad fúngica y el beneficio distinguible de los hongos en la biotransformación de los ingredientes de los alimentos, ha ayudado a sostener y extender nuestros recursos alimenticios. A pesar de la poderosa toxicidad de los metabolitos secundarios de varios hongos, la humanidad sobrevivió a ellos y a través de un uso innovador de los beneficiosos macro y micromicetos encontró un uso culinario, en particular, y otros usos de los hongos, en general **(Arora, 2004)**.

La importancia de los hongos se relaciona con su particular modo de crecimiento y proliferación, producción, y secreción de enzimas extracelulares, péptidos de funciones novedosas (sabor, funciones fisiológicas, y actividades antimicrobianas) metabolitos secundarios y los consecuentes antibióticos a la prevención del crecimiento microbiano infeccioso. Los biólogos moleculares de hoy en día trabajan con muy pocos hongos bien

estudiados, pero muchas otras de las 140,000 especies esperan en la línea de ser estudiadas (Arora, 2004).

A medida que tenemos una base creciente de algunas 10,000 especies fúngicas en varias colecciones y en la literatura del dominio público, tenemos algo del conocimiento relevante para la conexión cruzada hacia la biotecnología para la explotación de los hongos como alimento e ingredientes manufacturados para el beneficio humano (Arora, 2004).

Tabla 2. Especies Fúngicas Representativas en la Biotecnología de Alimentos (Arora, 2004).

Género y especie/sinónimo	Género y especie/sinónimo
Levaduras <i>Candida</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>maltosa</i> • <i>antarctica</i> • <i>pseudotropicalis</i> • <i>shehatae</i> • <i>utilis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kluyveromyces</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>lactis</i> • <i>marxianus</i> var. <i>maxianus</i> <i>Pachysolen tannophilus</i> <i>Phaffia rhodozyme</i> <i>Pichia stipitis</i> <i>Saccharomyces</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>bayanus</i> • <i>carlsbergensis</i> • <i>cerevisiae</i> • <i>exiguus</i> • <i>lipolytica</i> • <i>rosei</i> • <i>rouxii</i> • <i>sake</i> • <i>uvarum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Hongos filamentosos <i>Aspergillus</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>nidulans</i> • <i>niger</i> • <i>oryzae</i> <i>Mucor</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>hiemalus</i> • <i>miehei</i> • <i>pusillus</i> <i>Penicillium</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>album</i> • <i>camemberti</i> • <i>caseicolum</i> • <i>roquefortii</i> <i>Rhizopus</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>arrhizus</i> • <i>cohnii</i> • <i>delemar</i> • <i>niveus</i> • <i>oligosporus</i> • <i>oryzae</i> Hongos comestibles <i>Agaricus bisporus</i> <i>Agaricus campus</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Pholiota nameke</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Volvariella volvacea</i>

2. 3. 3. Producción de Hongos Comestibles

El mundo de los hongos, debido a su inesperada aparición en números, grupos, anillos, racimos, y también en aislamiento como una estructura única atractiva e imponente, ha fascinado al hombre desde tiempos inmemoriales y hay referencias disponibles en varias escrituras de muchas civilizaciones antiguas. Teofrasto (372-227 A.C.), el gran filósofo griego, escribió acerca del valor alimenticio de los hongos cuando los encontró en los

platos reales para los emperadores griegos y romanos. Existen indicios de que los hongos existieron mucho antes de que el *Homo sapiens* apareciera en la Tierra, alrededor de hace 130 millones de años; esto hace asumir que el hombre primitivo también consumió hongos. La colecta y consumo de hongos del medio silvestre es aún una práctica en muchas regiones del mundo, pero el escenario cambió después del cultivo artificial satisfactorio de hongos. Aunque los Chinos reportaron haber cultivado algunos hongos de especialidad como *Auricularia*, *Flammulina* y *Lentinula* entre los años 600-1000 D.C., indudablemente, fue el cultivo artificial del hongo botón común (champiñón, *Agaricus bisporus*) en Francia alrededor del año 1650 el que transformó el mundo del consumo y producción de los hongos **(Arora, 2004)**.

No todos los hongos son comestibles, ya que algunos son altamente venenosos. Mientras los macromicetos carnosos y comestibles son llamados hongos, los venenosos son llamados “setas venenosas”. Se ha estimado que de 10,000 especies de macromicetos carnosos, cerca de la mitad de ellos son comestibles y como mucho unas 100 especies son altamente venenosas. La colecta y consumo de hongos silvestres requiere conocimiento y una adecuada precaución. Ésta es una de las razones más importantes de la popularidad del cultivo artificial de hongos comestibles seguros **(Arora, 2004)**.

La producción comercial de hongos comestibles representa la única explotación de la tecnología microbiana donde los desperdicios sin valor (agrícolas, industriales, forestales, y domésticos) son convertidos eficientemente en alimentos nutritivos. El cultivo de hongos en interiores utilizando el espacio vertical es la forma de mayor producción de proteína por unidad de área y tiempo, casi 100 veces mayor que la ganadería y agricultura convencionales. Se tienen oportunidades promisorias para satisfacer la escasez de alimento mundial, sin una excesiva presión a la Tierra, para la población humana, la cual se incrementa a una tasa alarmante de casi 200,000 personas por día. De alrededor de 2000 hongos carnosos comestibles, 20 tipos están siendo cultivados artificialmente y alrededor de 10 están siendo producidos y comercializados en cantidades considerables: el hongo botón común (champiñón, *A. bisporus*), el hongo ostra (*Pleurotus* spp.), el Shiitake (*Lentinula edodes*), el hongo oreja negra (*Auricularia* spp.), el hongo de paja de arrozal (*Volvariella volvacea*), el hongo invernal (*Flammulina velutipes*), el hongo oreja plateada (*Tremella fuciformis*), el Nameko (*Pholiota nameko*), el hongo cabeza de mono

(*Hypsizygus marmoreus*) y dos famosos hongos medicinales llamados Maitake (*Grifola frondosa*) y el Reishi (*Ganoderma lucidum*) (Arora, 2004).

2. 3. 4. Producción Mundial de Hongos

La rápida tasa de desarrollo de la tecnología de producción de hongos a partir de un cultivo en caverna primitiva en Francia, a la industria de alta tecnología durante los pasados tres siglos, es un éxito histórico que ha conservado el paso con la demanda siempre en incremento de este producto, y existe toda razón para ser optimista acerca de este crecimiento en los años que vienen. De manejar 2 millones de toneladas en 1986, la producción mundial de hongos ha registrado un incremento de 3 veces su tamaño en una década y fue alrededor de 6 millones de toneladas en 1997, y cinco hongos, *A. bisporus*, *Pleurotus* spp., *Volvariella volvacea*, *Lentinula edodes* y *Auricularia* spp., los llamados líderes, suman el 82% del total de la producción de hongos (Arora, 2004).

Está claro que el champiñón (*A. bisporus*) es aún el líder contribuyendo con el 31.8% de la producción total de hongos, pero esta parte, que fue del 56.2%, se ha reducido con el paso de los años. China es el mayor productor de *Lentinula*, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Volvariella*, *Flammulina* y *Tremella*. Indonesia y Tailandia son los otros principales productores de *Volvariella*. Japón produce cantidades significativas de *Lentinula* y *Flammulina* y casi la cantidad total de *Hypsizygus* y *Grifola* que se produce en el mundo. La producción de *Agaricus* está concentrada en tres regiones geográficas: Europa, Norteamérica y el Este de Asia. En Europa, Holanda, Francia, y Reino Unido; en América, E.U.A. y Canadá; y en el este de Asia, además del gigante China, Indonesia y Taiwán son los otros productores principales de este hongo. Asia cuenta con la mayor parte de las importaciones de E.U.A. Es bastante interesante que los seis países llamados el grupo de los seis o los países G-6 (E.U.A., Alemania, Reino Unido, Francia, Italia, y Canadá) cuentan con más del 80% del consumo mundial; el consumo *per capita* en estos países es muy alto (2-3 kg). Un indicador importante de la demanda de hongos es el nivel de ingreso de la población en las naciones G-6. El aumento en el nivel de ingresos es un fenómeno global y la demanda de hongos se espera que crezca a una tasa mucho más rápida (Arora, 2004).

2. 4. Función Alimenticia y Medicinal de los Hongos

2. 4. 1. Introducción

Existen varias miles especies de hongos basidiomicetos y ascomicetos sobre la Tierra. Todas estas especies son un valioso recurso de conjuntos de genes. Muchas especies de hongos, debido a las técnicas biotecnológicas pueden ser aplicadas, siendo consideradas no sólo como materiales alimenticios (función fisiológica) sino también como materiales para el desarrollo de medicinas. Los hongos comestibles, en particular, están ahora siendo evaluados en términos de calidad nutricional (función primaria) y cuantificación de sus componentes, sabor, o preferencia (función secundaria), y por su función de biorregulación (función terciaria) de características dinámicas después de la ingestión **(Mizuno, 1995)**.

2. 4. 2. Funciones Dietarias de Hongos

2. 4. 2. 1. Características nutricionales (función primaria)

El valor nutricional de los hongos ha sido revisado por muchos trabajos. Es un hecho que existen amplias variaciones en los valores nutricionales reportados para las mismas especies por diferentes trabajos. Sin embargo, generalizaciones certeras emergen **(Arora, 2004)**. Ellos están divididos burdamente en tres grupos: (a) ricos en carbohidratos, (b) ricos en proteína, y (c) ricos en carbohidratos y proteína **(Mizuno, 1995)**. Aunque la constitución de carbohidratos es la principal fracción (50% de materia seca), ellos no son significativamente nutricionales **(Arora, 2004)**. Los carbohidratos de hongos están compuestos principalmente de sacáridos de bajo peso molecular, tales como la trehalosa, manitol, y arabinitol; y polisacáridos no digeribles, los cuales no son absorbidos a través de los intestinos humanos. Estos son fibra dietaria, tales como los β -glucanos, heteroglicanos, y quitina **(Mizuno, 1995)**. El contenido de fibra es alto en todos los hongos (10% del peso seco). Debido al muy alto (90%) contenido de humedad tienen básicamente una muy baja cantidad de calorías (25-35 calorías por 100 g de peso fresco) y esto se adecúa bien en esta era de alimentación saludable por el reducido consumo de calorías. Sin embargo, el contenido de grasa en los hongos es muy bajo, son ricos en ácidos grasos poliinsaturados y libres de colesterol. Los hongos, debido a su alta cantidad y calidad de proteína han sido reconocidos por la FAO como alimento aportador a la nutrición de proteína de los países que dependen ampliamente de los cereales. Como se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

espera, en la evaluación nutricional de los hongos, las proteínas han sido el punto de atención de los investigadores, sin embargo han sido reportadas amplias variaciones en los valores del contenido de proteína en los hongos. En términos de cantidad de proteína, los hongos se encuentran por debajo de los valores de la carne animal así como por encima de los vegetales y frutas comunes. La calidad de la proteína de los hongos es por mucho superior a la de la proteína vegetal y es tan buena o ligeramente inferior a la de las proteínas animales. Esto es debido a que todos los aminoácidos esenciales están presentes en los hongos e, interesantemente, el más abundante es la lisina, el cual en los cereales es deficiente. Por lo tanto, se ha sugerido que los hongos pueden suplementar las dietas a base de cereales de los países en desarrollo (**Arora, 2004**). Es bien conocido que los hongos generalmente contienen ergosterol (100-800 mg/100 g, peso seco), el cual es convertido a vitamina D2 cuando la pulpa es secada por luz y calor (**Mizuno, 1995**). Los hongos son ricos en vitaminas del complejo B y una mención especial es realizada por la presencia del ácido fólico y vitamina B12. Aunque la vitamina C está presente, ésta es vulnerable a las pérdidas poscosecha debido a su muy alta actividad de la enzima polifenol oxidasa. El potasio, sodio, fósforo y magnesio son los minerales predominantes. El hierro se encuentra presente en cantidades apreciables en su forma disponible pero los hongos son relativamente deficientes en calcio (**Arora, 2004**).

2. 4. 2. 2. Características de preferencia (función secundaria)

Es principalmente el sabor y la textura por lo cual los hongos son devorados por la humanidad, y la apreciación científica de sus atributos nutricionales y médicos es un fenómeno reciente (**Arora, 2004**). El deseo de un alimento no tiene correlación hacia su valor nutricional. Además del valor nutricional, los alimentos deben estimular nuestro apetito (preferencia) por su apariencia, sabor, y aroma. Además de una combinación bien balanceada de color, sabor, y aroma, las características de textura atractiva deben ser mantenidas después de la preparación. El umami, el completo, sabor redondeado (como es definido por el japonés) de un hongo es predominantemente el resultado de la presencia de glutamato monosódico, además mejorado con la adición de cantidades menores de nucleótidos, tales como el monofosfato de guanidina (GMP) y monofosfato de adenosina (AMP). El ácido tricolómico y el ácido iboténico también han sido encontrados. Los componentes del aroma del Matsutake son el matsutakeol y el metilcinamato. Un compuesto que contiene azufre, el ácido lentínico, en el Shiitake fresco es insípido, pero

es convertido por calor a lenthionina, el cual es responsable del sabor específico cuando el hongo del Shiitake es secado **(Mizuno, 1995)**.

Los terpenoides en Mannentake (*Ganoderma lucidum*) tienen propiedades medicinales. Un total de 45 triterpenoides de la serie de los lanostatos – incluyendo el ácido ganodérico (GA), ácido ganolucidénico (GLA), ácido lucidénico (LA), ganoderiol (G), y lucidona (L) - han sido aislados, y sus estructuras han sido determinadas. Varios de estos terpenoides tienen poco sabor y se ha descubierto que existe una correlación entre el poco sabor y la estereoquímica de estos compuestos **(Mizuno, 1995)**.

Lo crujiente y la textura de los hongos cocinados son afectadas por las propiedades físicas de la pared celular y la constitución de polisacáridos del citoplasma tales como los α y β -glucanos, heteropolisacáridos y quitinas así como también proteínas **(Mizuno, 1995)**.

2. 4. 2. 3. Características fisiológicas (función terciaria)

En esta era de una dieta consciente, los hongos son frecuentemente servidos como un alimento bajo en calorías y debido a su textura característica y sabor delicioso. Además, varias características fisiológicas (efectos farmacológicos) han sido encontradas en hongos, tales como biorregulación (activación inmune), mantenimiento de la constancia biológica (homeostasis), regulación del biorritmo, restauración de enfermedades, y prevención y mejora de enfermedades de adultos tales como el cáncer, embolia cerebral, y enfermedades del corazón. Muchos componentes están también siendo confirmados como efectivos en la remoción del colesterol, mejoradores de la hiperlipidemia, antitrombóticos, reductores de la alta presión sanguínea, acción hipoglucémica, mejoradores de la demencia senil, etc. Por consiguiente, muchos métodos de utilización de hongos están siendo probados como materiales alimenticios orientados a la salud (alimentos fisiológicamente funcionales) **(Mizuno, 1995)**.

Muy significativas actividades farmacológicas han sido observadas en algunos hongos; una industria de un billón de dólares existe para los hongos medicinales llamados Reishi (*Ganoderma lucidum*), Maitake (*Grifola frondosa*), Shiitake (*L. edodes*), *Trametes versicolor*, etc. **(Arora, 2004)**.

2. 4. 3. Hongos con Actividad Farmacológica

2. 4. 3. 1. Introducción

El uso medicinal de los hongos tiene una muy fuerte tradición en los países de Asia, mientras que su uso en el hemisferio occidental ha estado incrementando sólo un poco durante las décadas pasadas. La edición de la nueva revista científica *International Journal of Medicinal Mushrooms*, varios libros y revisiones acerca de hongos medicinales y compuestos biológicamente activos de hongos así como también conferencias internacionales acerca de este tema confirman esta tendencia. El valor en el mercado de los hongos medicinales y sus suplementos dietarios derivados alrededor del mundo fueron de 1.2 billones de dólares en 1991 y fue estimado en 6 billones de dólares en 1999 (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 2. Hongos antibacteriales y antifúngicos

Los hongos necesitan compuestos antibacteriales y antifúngicos para sobrevivir en su ambiente natural. Por lo tanto no es sorprendente que compuestos antimicrobianos con más o menos actividades fuertes pudieran ser aislados de muchos hongos y que pudieran ser de beneficio para el humano. Pero sólo compuestos de hongos microscópicos están en el mercado como antibióticos hasta ahora (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 3. Actividad contra bacterias multirresistentes

De especial interés son los compuestos con actividades contra cepas de bacterias multirresistentes. Un ejemplo de estos son las hidroquinonas sesquiterpenoides producidas por una especie de *Ganoderma* europea: *Ganoderma pfeifferi*, y llamadas ganomicinas; inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente y otras bacterias. Además los extractos de este hongo inhiben el crecimiento de microorganismos responsables de problemas de la piel (*Pityrosporum ovale*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*) (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 4. Actividades antimicrobianas de compuestos conocidos

El ácido aplanoxídico aislado de *Ganoderma annulare*, mostró tener una débil actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*. Esteroides aislados de *Ganoderma applanatum* probaron ser débilmente activos contra numerosos microorganismos Gram-

positivos y negativos. El ácido oxálico es el agente responsable del efecto antimicrobiano de *Lentinula edodes*. Los extractos etanólicos de *L. edodes* poseen actividades antiprotozoarias contra *Paramecium caudatum* (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 5. Hongos antivirales

Efectos antivirales han sido descritos no sólo para extractos enteros de hongos sino además para compuestos aislados. Tales efectos pueden ser causados directamente por inhibición de enzimas virales, síntesis de ácidos nucleicos virales, o adsorción y absorción de virus en células de mamíferos. Estos efectos antivirales son mostrados especialmente por moléculas muy pequeñas. Los efectos antivirales indirectos son el resultado de una actividad inmunoestimulante de polisacáridos u otras moléculas complejas (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 6. Hongos antitumorales

Las enfermedades causadas por tumores son una de las principales causas de muerte en el mundo entero. La experiencia de países de Asia y Europa del Este muestra que los hongos pueden jugar un importante papel en la prevención y tratamiento de cáncer. El hongo *Piptoporus betulinus* fue usado tradicionalmente en Bohemia para el tratamiento de cáncer rectal y enfermedades del estómago (Lindequist y col., 2005).

En Europa del Este, los cuerpos fructíferos de *Inonotus obliquus* ha sido usado como una medicina folclórica para el cáncer y enfermedades del estómago desde los siglos XVI y XVII. Los efectos antitumorales de varios extractos y compuestos aislados pueden ser demostrados en sistemas de células tumorales y en ensayos animales. Varios triterpenos y peróxido de ergosterol contribuyen a la actividad. El complejo melanínico de *I. obliquus* tiene un alto efecto antioxidante y genoprotectivo sobre oxidación catalizada por peroxidasa de aminodifenilos (Lindequist y col., 2005).

Los llamados “inmunomoduladores” (modificadores de respuesta biológica, inmunopotenciadores e inmunoestimulantes) son las drogas usadas más importantes de hongos medicinales especialmente en Japón, China, Corea y otros países del este de Asia hoy en día (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 7. Inmunomoduladores de hongos y adyuvantes en la terapia antitumoral

Algunos polisacáridos o complejos polisacáridos-proteína de hongos son capaces de estimular de forma no específica el sistema inmune y ejercer actividad antitumoral a través de la estimulación de los mecanismos de defensa del huésped. Las drogas activan células efectoras como los macrófagos, linfocitos T y células Natural Killer (NK) para secretar citocinas como el TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , etc., las cuales son antiproliferativas e inducen apoptosis y diferenciación en células tumorales. Existe evidencia de que los β -glucanos inducen una respuesta biológica por la unión al receptor complemento de membrana tipo 3 (CR3, integrina alfaM β 2 ó CD11b/CD18) sobre células inmunes efectoras (Lindequist y col., 2005).

Existen hongos con polisacáridos inmunomoduladores que son usados como un alimento delicioso o como alimento promotor de la salud (nutracéutico) o como droga en regiones geográficas limitadas. Sin embargo, actualmente los estudios científicos o clínicos no son suficientes para su uso como medicamento oficial alrededor del mundo (Lindequist y col., 2005).

Actividades citostáticas contra células tumorales fueron mostradas *in vitro* para varios hongos o componentes de hongos; ejemplo de ello son las proteasas (péptidos con un peso molecular de 8 kDa) de los cuerpos fructíferos de *Handkea utriformis*, ribosomas inactivadores de proteínas de *Hypsizygus marmoreus* y lectinas de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. El extracto en etilenoacetato del esporocarpio de *Phellinus rimosus* posee una actividad antitumoral significativa comparable a la actividad de cisplatina en modelos de ascitis y tumor sólido en ratón (Lindequist y col., 2005).

Varios compuestos de bajo peso molecular exhiben actividad citotóxica contra células tumorales. Estos compuestos han sido aislados de varios hongos como sesquiterpenoides tricíclicos de *Omphalotus olearius* y *Lampteromyces japonicus*, el terpenoide leaiananfulveno de *Mycena leaiana*, ácidos ganodérico Z, Y, X, W, V, T; lucialdehídos A, B, C y ácido austrálico de *G. lucidum* o *Ganoderma austral*; el acetoxiscirpenediol, peróxido de ergosterol de *Paecilomyces tenuipes* y esteroides del micelio de *Cordyceps sinensis*. También triterpenos de *Ganoderma concinnum* y los triterpenos de ácido aplanoxídico A-H aislados de *G. applanatum* (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 8. Hongos inmunosupresivos y antialérgicos

Aunque los extractos de muchos hongos pueden estimular el sistema inmune, algunos suprimen las respuestas inmunes. Esto podría ser de interés, por ejemplo para el tratamiento de enfermedades alérgicas que se están incrementando alrededor del mundo **(Lindequist y col., 2005)**.

Los extractos etanólicos de los basidiomicetes comestibles japoneses *H. marmoreus*, *F. velutipes*, *Pholiota nameko* y *Pleurotus eryngii* muestran efectos antialérgicos significativos en ratón (alergia tipo IV inducida por oxazolona). Algunos compuestos de *G. lucidum* (ácidos ganodéricos C y D; ciclooctasulfuro) inhiben la liberación de histamina de mastocitos de rata. El consumo de *Tricholoma populinum* conduce a la regresión de síntomas alérgicos severos en pacientes con tromboangitis destructiva y en otros pacientes con urticaria. Los efectos pueden ser confirmados en modelos animales, como uno de los compuestos responsables el peróxido de ergosterol. El hispolon e hispidina, aislada de los cuerpos fructíferos de *Inonotus hispidus*, inhiben la respuesta quimioluminiscente de células de sangre mononucleares humanas y la proliferación inducida por mitógeno de linfocitos de vaso de ratón **(Lindequist y col., 2005)**.

El choque séptico es un complejo síndrome mediado por la unión de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas a receptores CD14 sobre células inmunes y la consiguiente liberación de una cascada de mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno. Debido al gran número de pacientes con choque séptico un gran acuerdo de esfuerzos es necesario para el desarrollo de nuevas posibilidades terapéuticas. Los extractos de cuerpos fructíferos de *Polyporus badius*, *Lactarius vellereus*, *Heterobasidion annosum*, *Trametes versicolor* y *Piptoporus betulinus* inhiben la unión *in vitro* de LPS al receptor y podrían por lo tanto contener estructuras específicas para drogas contra choque séptico mediado por LPS **(Lindequist y col., 2005)**.

La activación del sistema de complemento, induciendo la liberación de mediadores de los mastocitos, puede causar una variedad de enfermedades y puede ser fatal si ocurriera después de un trasplante de órgano. Varios triterpenos de *G. lucidum* (ganoderiol F, ganodermanontriol y ganodermanondiol) muestran una fuerte actividad anticomplemento contra la vía clásica del sistema de complemento **(Lindequist y col., 2005)**.

2. 4. 3. 9. Hongos antiaterogénicos

Las especies reactivas de oxígeno y los niveles aumentados de lípidos sanguíneos son elementos clave en la patogénesis de la aterosclerosis, una de las principales causas de muerte en países industrializados. El control de los lípidos sanguíneos, especialmente colesterol, es importante para reducir el riesgo del desarrollo o progresión de la aterosclerosis (Lindequist y col., 2005).

Algunos triterpenos de *G. lucidum* (ácido ganodérico C y sus derivados) son capaces de inhibir la biosíntesis del colesterol. Otros triterpenos de este hongo contribuyen a la protección contra la aterosclerosis por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ácido ganodérico F) o de la agregación de plaquetas (ácido ganodérico S). Los efectos antioxidativos y de secuestro de radicales libres de los polisacáridos y triterpenoides de *G. lucidum* fueron demostrados en diferentes modelos de daño oxidativo incluyendo macrófagos peritoneales de ratón dañados con ter-butilhidroperóxido, diabetes inducida por alloxan y modelos de daño de hígado experimental. La inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por células endoteliales y de la adhesión de monocitos a células endoteliales, ha sido demostrada. El efecto antilipídico de *L. edodes* es causado por la eritroadenina, un derivado de nucleótido (Lindequist y col., 2005).

Compuestos *p*-terfenilo de *Thelephora ganbajun*, *Thelephora aurantiotincta*, *Boletopsis grisea* así como también de *Paxillus curtissii* mostraron tener fuertes propiedades antioxidativas. La betulina A de *Lenzites betulinus* es alrededor de cuatro veces más activo como secuestrador de radicales que la vitamina E en la inhibición de peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica es también inhibida por las esterinas A y B de *Stereum hirsutum* (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 10. Hongos hipoglucemiantes

La diabetes mellitus es un desorden metabólico que afecta alrededor de 250 millones de personas alrededor del mundo. Modalidades de tratamientos más seguros y más efectivos para los pacientes con diabetes tipo 2 necesitan ser investigados, concentrándose en superar la resistencia a la insulina secundaria. Una fracción de polisacáridos de *G. frondosa* (fracción SX) mostró actividad hipoglucémica en cinco pacientes con diabetes tipo 2 (Lindequist y col., 2005).

Los compuestos ganoderano A y B, glucanos de los cuerpos fructíferos de *G. lucidum*, coriolano, un complejo β -glucano-proteína obtenido de la biomasa que crece sumergida de *T. versicolor*, y una glucuronoxilomanana acídica de los cuerpos fructíferos de *Tremella aurantia* exhibieron efectos hipoglucémicos en varios sistemas de prueba y mejoró los síntomas de la diabetes (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 11. Hongos antiinflamatorios

Los extractos etanólicos y un proteoglicano de *P. linteus* mostró efectos antiinflamatorios en artritis inducida por colágeno en ratón y efecto antinociceptivo en pruebas de dolor. Otros compuestos como los ácidos ganodéricos A, B, C y H aislados de *G. lucidum* fueron efectivos en pruebas de dolor. Estas sustancias mostraron un efecto más fuerte en este modelo animal que el ácido acetilsalicílico (Lindequist y col., 2005).

Los extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus pulmonaris* (500 y 1000 mg/kg) redujeron el edema de pata inducido por carragenina y formalina en ratón. La actividad fue comparable al diclofenaco de referencia (10 mg/kg). El efecto pareció estar relacionado a la significativa actividad antioxidante del extracto (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 12. Hongos hepatoprotectivos

Los ácidos ganodéricos R y S y el ácido ganosporérico A de *G. lucidum* mostraron actividad antihepatotóxica *in vitro* en pruebas citotóxicas inducidas por galactosamina con un cultivo primario de hepatocitos de rata. En un ensayo *in vitro*, dos fracciones de los extractos de triterpenoides totales de *G. lucidum* (75% etanol) pueden proteger al ratón contra necrosis hepática inducida por cloroformo y D-galactosamina. Los efectos hepatoprotectivos fueron tal vez relacionadas a la habilidad de promover la actividad de secuestro en enzimas para radicales libres hepáticos de ratón, y así aumenta la capacidad de antioxidación en ratón (Lindequist y col., 2005).

Ganopoly, una preparación de *G. lucidum* que contiene polisacáridos, fue probada en estudios doble ciegos, aleatorizados y multicentros en pacientes con hepatitis B crónica. Dentro de los 6 meses de periodo de estudio, 33% de los pacientes tratados tuvieron valores normales de aminotransferasa y 13% tuvieron antígeno de superficie de hepatitis B eliminado del suero, mientras ninguno de los controles tuvieron valores de

enzimas normales o tuvieron pérdida de los antígenos. La droga fue bien tolerada (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 13. Hongos con actividades centrales

Además de los bien investigados hongos psicoactivos tales como *Amanita muscaria* o especies de *Psilocybe*, a algunos extractos y compuestos adicionales de hongos se les han encontrado efectos centrales especiales que podrían ser de interés farmacológico (Lindequist y col., 2005).

Compuestos análogos de fenólicos (hericenonas C, D, E, F, G, H) de *Hericium erinaceus* inducen la síntesis del factor de crecimiento nervioso y podría tener un efecto en el mejoramiento de la demencia por Alzheimer. La erinacina E del caldo de fermentación de *Hericium coralloides* es un agonista altamente selectivo en el receptor opioide kappa. Tales compuestos pueden exhibir actividad antinociceptiva sin efectos secundarios con agonistas del receptor μ como la morfina (Lindequist y col., 2005).

Investigaciones de basidiomicetos seleccionados indican efectos inhibitorios de *P. betulinus*, *G. applanatum*, *Heterobasidion annosum*, *Fomitopsis pinicola* y *Daedaleopsis confragosa* sobre la endopeptidasa neutra (encefalinas, EC 3.4.24.11). Los inhibidores selectivos de esta metaloendopeptidasa podrían ser útiles en el tratamiento del dolor con un espectro similar al de los opioides (Lindequist y col., 2005).

2. 4. 3. 14. Perspectivas

Los hongos, al igual que las plantas, tienen un gran potencial para la producción de metabolitos bioactivos útiles y son prolíficos recursos para el desarrollo de medicamentos (Lindequist y col., 2005).

El espectro de actividades farmacológicas detectadas en hongos es muy amplio. Dependiendo del incremento en el conocimiento acerca de la química, biotecnología y biología molecular de los hongos así como también una mejoría de los métodos de investigación (alto rendimiento de investigación, genómica y proteómica), se puede esperar un rápido incremento en las aplicaciones de los hongos para propósitos medicinales (Lindequist y col., 2005).

Un acondicionamiento previo para el uso como droga, nutracéutico u otro propósito es la continua producción de hongos (cuerpos fructíferos o micelio) en altas cantidades y en una calidad estandarizada. Una necesidad más es el establecimiento de parámetros apropiados de calidad y de métodos analíticos para controlar estos parámetros. Sin embargo, las regulaciones legales para la autorización como droga o como suplementos dietarios o como alimento debería de tener más atención **(Lindequist y col., 2005)**.

2. 5. Huitlacoche (*Ustilago maydis*)

2. 5. 1. Introducción

Los hongos comestibles han sido parte de la dieta humana en muchas culturas desde hace mucho tiempo. Ellos han sido muy apreciados por sus propiedades sensoriales poco comunes que les imparten a una gran variedad de platillos. Aunque son conocidas alrededor de 2000 especies de hongos comestibles, solo unas cuantas son cultivadas comercialmente. Encabezando la lista está el *Agaricus bisporus* seguido por varios otros, la mayoría de los cuales crecen sobre sustratos inertes de desechos como saprófitos **(Valverde y col., 1995)**.

Huitlacoche es el nombre que aplicaron los aztecas al cuerpo fructífero joven y comestible de *Ustilago maydis*, el cual es el agente causal del carbón del maíz. Esta enfermedad es caracterizada por la presencia de agallas en varias partes aéreas de las plantas, incluyendo tallos, hojas, borlas y espigas. Las espigas pueden ser completamente cubiertas por las agallas **(Valverde y col., 1995)**.

El huitlacoche es un basidiomiceto del orden de los Ustilaginales, algunas características de estos son las siguientes:

- Infectan estructuras reproductivas de las plantas, principalmente flores.
- El desarrollo del micelio no es profuso.
- El promicelio está septado transversalmente, con basidiosporas laterales y terminales.

Pertenece al género *Ustilago*, cuyas especies:

- Tienen soros con apariencia de hollín y vagamente lleno con teliosporas negras o café oscuro.

Y la especie *maydis*, nos habla del que es un parásito del maíz (**Valverde y col., 1995**).

Por sus atributos sensoriales y nutricionales los hongos son muy apreciados como parte de la dieta en muchas culturas. Las agallas producidas por el hongo *Ustilago maydis* en las mazorcas de maíz se conocen como huitlacoche o cuitlacoche y en México se consume desde la época prehispánica. Generalmente se recolecta y vende en estado fresco y envasado, y se le considera una exquisitez culinaria (**Paredes y Valverde, 2006**).

La popularidad del huitlacoche como comida típica nuestra ha rebasado las fronteras de México y su presencia en el mundo es cada vez más visible. Recientemente la demanda de este exquisito hongo ha aumentado considerablemente y se ha introducido a los Estados Unidos, donde se le han asignado diferentes nombres como caviar azteca y trufa mexicana, y se lo ha aplaudido en revistas como *Play Boy*, *Vogue* y otras (**Paredes y Valverde, 2006**).

El huitlacoche, como alimento típico mexicano, debe su creciente popularidad a su característico sabor, que no se parece a ningún otro alimento conocido. En este sentido podemos hablar de sabor de huitlacoche, de igual manera que nos referimos a chocolate, fresa, vainilla, etc.; como sabores clásicos. Existen ciertos compuestos que intervienen en el sabor de diferentes hongos. Sin embargo, algunos compuestos solamente están presentes en el huitlacoche y no en ningún otro hongo (**Paredes y col., 2006**).

El valor dado a los alimentos está basado ampliamente en su composición química. El huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas minerales y vitaminas, que contribuyen a este valor nutricional. Así, considerando esta composición química, el huitlacoche es de muy especial interés en el consumo humano (**Valverde y col., 1995**).

2. 5. 2. Propiedades Alimentarias y Nutraceuticas del Huitlacoche

2. 5. 2. 1. Proteínas y aminoácidos

La cantidad de proteínas es relativamente moderada pero más alta que la que presenta el maíz y otros cereales. El huitlacoche contiene grandes cantidades de los aminoácidos histidina, treonina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y serina. Los aminoácidos

deficientes, comparado con los patrones de la FAO/WHO/UNU (1985) para niños en edad preescolar, fueron isoleucina, leucina, treonina y aminoácidos azufrados. Sin embargo, la proteína del huitlacoche contiene cantidades adecuadas de todos los aminoácidos esenciales para adultos. Las proteínas de los hongos, como otras proteínas fúngicas, son consideradas proteínas de calidad intermedia entre las vegetales y animales **(Valverde y col., 1995)**.

2. 5. 2. 2. Grasas, carbohidratos y fibra

El contenido de carbohidratos y fibra es alto. Una baja cantidad de grasa resulta en bajas cantidades de calorías y colesterol. Interesantemente, el huitlacoche contiene altos niveles de ácido linoléico y ácidos grasos esenciales **(Valverde y col., 1995)**.

2. 5. 2. 3. Sustancias involucradas en el sabor

El sabor del huitlacoche está determinado por una amplia gama de compuestos, tanto volátiles (derivados de ácidos grasos, cetonas, aldehídos, etc.) como no volátiles (AA libres, carbohidratos) **(Paredes y col., 2006)**.

Tabla 3. Compuestos que Intervienen en el Sabor del Huitlacoche (Paredes y col., 2006).	
Compuestos no volátiles	
Aminoácidos libres	Alanina y ácido glutámico
Carbohidratos	Glucosa, manitol, sacarosa
Compuestos volátiles	
Derivados de ácido graso	1-octeno-3-ol
Cetonas	[1(2-hidroxi-5-metil-fenil)]
Aldehídos	Octanal, fenilacetaldehído, undecenal, dodecenal
Ésteres	Ácido heptadecanoico, metil éster; ácido 9-hexadecanoico, metil éster; ácido linoléico, etil éster; ácido oleico, etil éster

2. 5. 2. 4. Propiedades nutraceuticas

También se han identificado compuestos fenólicos en altas concentraciones, las cuales poseen propiedades antioxidantes que son muy útiles para prevenir enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis, y por lo tanto se puede incluir en lo que se conoce actualmente como alimentos nutraceuticos **(Beas-Fernández y col., 2008; Beas-Fernández y col., 2006; Paredes y col., 2006)**.

Por otro lado se ha encontrado que la sepa P4 de este hongo, excreta una toxina fúngica, la toxina KP4, ésta es codificada por un virus fúngico (UMV4) que persistentemente

infecta las células de este hongo. Este virus, a diferencia de la gran mayoría de los virus (no fúngicos), no se esparce hacia células no infectadas por liberación en el entorno extracelular durante su ciclo de vida normal y es de esta manera dependiente de la supervivencia del hospedante para replicarse. En simbiosis con el hongo hospedante, el UMV4 codifica la KP4 para asesinar a otras sepas competitivas de *U. maydis*, de ese modo promoviendo la supervivencia de ambos, virus y hospedante. Experimentos demostraron que la toxina inhibe específicamente los canales de Ca^{+2} abiertos por voltaje en células mamíferas. Estos resultados sugieren que ciertas propiedades de los canales de Ca^{+2} fúngicos son homólogos a los de células mamíferas. La toxina KP4, por lo tanto, es una nueva herramienta para estudiar los canales de Ca^{+2} mamíferos (Gu y col., 1995). Es importante mencionar que las contracciones de todos los músculos lisos incluyendo aquellos del tracto gastrointestinal, dependen absolutamente de la presencia de Ca^{+2} . Consecuentemente, las contracciones del musculo liso pueden ser abolidas por agentes antiespasmódicos a través de la inhibición de la entrada o liberación de Ca^{+2} dentro de las células (Borrelli y col., 2006). Por lo tanto este hongo podría tener efectos sobre la motilidad intestinal en mamíferos.

2. 6. Hongo Ostra o Setas Comestibles (*Pleurotus* spp.)

2. 6. 1. *Pleurotus* spp.

Pleurotus spp. son los más versátiles de todos los hongos, representando alrededor de quince especies capaces de crecer sobre un amplio rango de temperatura y sobre casi todos los desechos lignocelulósicos; *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. ostreatus*, y *P. flabellatus* son las especies comerciales más populares. Es un hongo de pudrición primario y puede degradar directamente sustratos humedecidos y no requiere sustratos precomposteados como los hongos de putrefacción secundarios como *A. bisporus*. La facilidad con la cual los hongos ostra pueden crecer se ha manifestado en las estadísticas de producción donde la producción del hongo ostra registró un aumento del 442% durante el periodo comprendido de 1980-1991 (Arora, 2004).

Éste puede ser encontrado naturalmente en bosques lluviosos tropicales y subtropicales. Apreciado debido a su delicioso sabor, este hongo tiene altas cantidades de proteína,

carbohidratos, minerales (calcio, fósforo, hierro) y vitaminas (tiamina, riboflavina y niacina) así como también poca grasa (**Bonatti y col., 2004**).

Por muchas razones los hongos del género *Pleurotus* han sido estudiados intensamente en muchas diferentes partes del mundo: ellos tienen un alto valor gastronómico, son capaces de colonizar y degradar una gran variedad de residuos lignocelulósicos, requieren corto tiempo de crecimiento cuando se compara con otros hongos comestibles, requieren pocos cuidados ambientales, sus cuerpos fructíferos no son muy comúnmente atacados por enfermedades y pestes y pueden ser cultivados de forma simple y barata (**Bonatti y col., 2004**).

2. 6. 2. *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es el tercer hongo comestible más importante alrededor del mundo. Éste puede descomponer eficientemente la lignocelulosa sin pretratamientos químicos o biológicos debido a que posee un complejo sistema enzimático que incluyen fenoloxidasas y peroxidasas. Por lo tanto, una amplia variedad de desechos lignocelulósicos pueden ser utilizados y reciclados por fermentación en estado sólido con este hongo (**Snchez y col., 2002**).

Se ha reportado que los nutrientes de *P. ostreatus* son los siguientes:

Parámetro	Valores alcanzados	Valor promedio
Humedad (g/100 g)	85.24 - 94.70	90.0
Proteína (g/100 g, base húmeda)	1.18 - 4.92	1.53
Cenizas (g/100 g, base húmeda)	0.52 – 1.15	0.71
Na (mg/kg, base húmeda)	1.3 – 20.1	10.11
K (mg/kg, base húmeda)	182.5 – 395.9	264.7
Mg (mg/kg, base húmeda)	8.6 – 4.5	11.6
Ca (mg/kg, base húmeda)	1.4 – 3.9	4.2

2. 6. 3. Propiedades Farmacológicas de Hongos del Género *Pleurotus*

Pleurotus sajor-caju es un basidiomiceto perteneciente al género *Pleurotus*, del orden Agaricaceae como *P. ostreatus*. Es un sabroso hongo comestible que ahora está siendo cultivado (**Mizuno, 1995**).

Los cuerpos fructíferos de este hongo crecidos en China contienen del 85-90% de humedad, bajos niveles de lípidos, y prácticamente no contienen almidón, pero un α -glucano (un polisacárido glucogénico) está presente. La proteína está alrededor de un 21% en base seca. Ocho aminoácidos esenciales para el humano se encuentran presentes en éste. Es alto en lisina y treonina al compararlo con otros hongos. Contiene varios minerales y vitaminas, incluyendo 33 mg de vitamina C, 0.2-0.3 mg de vitamina B1, 1.1-1.4 mg de vitamina B2, y de 18.2-21.3 mg de niacina por 100 g de materia seca. Se ha afirmado que la ingesta diaria disminuye el nivel de colesterol en sangre, previene el cáncer, y muestra actividad carcinostática basada en inmunoactivación **(Mizuno, 1995)**.

En este hongo cinco polisacáridos exhibieron alta actividad antitumoral cuando fueron probados por el método de sarcoma 180 de ratón. De los polisacáridos con actividad antitumoral de este hongo (cuerpos fructíferos), los proteínxiloglucanos y proteínmanogalactanos fueron componentes solubles en agua; y los proteín glucoxilano, y el glucoxilano fueron componentes insolubles en agua **(Mizuno, 1995)**.

Para extractos metanólicos de *P. ostreatus* se encontraron efectos antimutagénicos. Una dieta de hongo ostra (*P. ostreatus*) (5%) redujo los cambios patológicos en cáncer colorrectal de ratas inducido por dimetilhidrazina pero no influyo de forma significativa en la incidencia de tumores. Este efecto es explicado por las actividades antioxidantes de este hongo y por su contenido en fibra **(Lindequist y col., 2005)**.

Han sido demostrados efectos protectivos contra el cáncer en los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* en ratas. Además, *P. ostreatus* disminuye la toxicidad de la ciclofosfamida en ratón **(Lindequist y col., 2005)**.

También se ha encontrado un pronunciado efecto hipocolesterolémico del hongo ostra (*P. ostreatus*), combinado con inhibidores de la peroxidación de lípidos; esto ha sido demostrado en ratas y conejos. Una dieta de hongo ostra (10% cuerpos frutales secos) reduce significativamente la incidencia y tamaño de placas ateroscleróticas en conejos. La lovastatina, el principal compuesto de las estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa), pudo ser detectado en esta especie **(Lindequist y col., 2005)**.

2. 7. Compuestos Fenólicos en Alimentos y Nutraceuticos

Los compuestos fenólicos en alimentos y nutraceuticos son originados de una de las principales clases de metabolitos secundarios en plantas derivados de la fenilalanina y, en menor grado en algunas plantas, de la tirosina. Químicamente, los fenólicos pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático portando uno o más grupos hidroxilos, incluyendo sus derivados funcionales. Su ocurrencia en tejidos animales y materiales no vegetales es generalmente debido a la ingestión de alimentos vegetales **(Shahidi y Naczk, 2004)**.

Las plantas y alimentos contienen una gran variedad de derivados fenólicos incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, ácido benzoico y derivados, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas y ligninas. Junto con los ácidos carboxílicos de cadena larga, los compuestos fenólicos son también componentes de la suberina y cutina. La contribución de los compuestos fenólicos a la pigmentación de los alimentos es también bien reconocida. Además, los compuestos fenólicos actúan como antibióticos, pesticidas naturales, sustancias señales para el establecimiento de simbiosis, atrayentes de polinizadores, agentes protectivos contra la luz ultravioleta (UV), materiales de aislamiento para hacer las paredes celulares impermeables al gas y agua y como materiales estructurales **(Shahidi y Naczk, 2004)**.

2. 7. 1. Compuestos Fenólicos en Hongos

Los hongos han sido usados por siglos tanto como alimentos y medicina principalmente en países asiáticos. En general, los hongos cultivados contienen poca grasa y carbohidratos digeribles, pero tienen altos contenidos de proteínas más que los vegetales. También son ricos en vitaminas B, D y K, y algunas veces vitaminas A y C, haciéndolos apropiados para dietas hipocalóricas. Los hongos también han sido reportados por tener propiedades antioxidantes. Algunos ejemplos de ello son varios hongos cultivados tales como el *Agaricus bisporus*, *Hericium erinaceus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii*, y *Pleurotus ostreatus*, los cuales han mostrado significativas actividades antioxidantes y de secuestro de radicales libres. Tales propiedades también han sido reportadas en hongos medicinales, incluidos *Agaricus blazei*, *Sparassis crispa*, *Phellinus linteus*, *Ganoderma lucidum* y *Inonotus obliquus* **(Kim y col., 2008)**.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los compuestos fenólicos son uno de los productos secundarios de plantas más ampliamente distribuidos. La capacidad de estos compuestos para actuar como antioxidantes ha sido bien establecida. Los polifenoles son antioxidantes multifuncionales por actuar como agentes reductores, antioxidantes donadores de hidrógeno y atrapadores-apagadores de oxígeno. Los hongos por su parte, contienen una variedad de metabolitos secundarios, incluidos varios compuestos fenólicos, los cuales han demostrado actuar como excelentes antioxidantes **(Dubost y col., 2007)**.

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados como fenoles simples y ácidos fenólicos tales como el ácido gálico, ácido benzoico, ácido siríntrico, ácido clorogénico, y otros asociados; y polifenoles, los cuales son clasificados dentro de muchos grupos tales como flavonoides, taninos, estilbenos, etc. Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos con propiedades conocidas de beneficio a la salud, los cuales incluyen atrapamiento de radicales libres, inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas, y acción antiinflamatoria. Algunas evidencias sugieren que las acciones biológicas de estos compuestos son relacionadas a su actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos tienen propiedades farmacológicas y biológicas significativas, y algunos han demostrado una capacidad notable para alterar la conjugación de sulfato. La bioactividad de los compuestos fenólicos puede estar relacionada a su capacidad para quelar metales, inhibir lipooxigenasa, y atrapar radicales libres **(Kim y col., 2008)**. Los radicales libres son definidos como cualquier molécula o átomo con uno o más electrones desapareados. Con la posesión de electrones desapareados, los radicales libres son usualmente inestables y altamente reactivos. El radical peroxilo es un paso clave en la peroxidación lipídica y es una causa importante de destrucción de la membrana celular y de esta manera daño tisular. Así, el consumo de antioxidantes dietarios de estos recursos es benéfico en la prevención de enfermedades **(Lo y Cheung, 2005)**.

Los contenidos de compuestos biológicamente activos pueden variar considerablemente en los hongos. Los compuestos biológicamente activos son afectados por las diferencias en la cepa, sustrato, cultivo y condiciones de fructificación, el estado de desarrollo del hongo, y la edad de la muestra de hongo fresca. Además, los contenidos de agua de los hongos naturalmente afectan su contenido de nutrientes cuando los resultados son calculados en base al peso fresco. Los contenidos de agua de los hongos pueden variar

dependiendo del cultivo y condiciones de humedad durante el cultivo (**Mattila y col., 2001**).

En cuanto al huitlacoche existen pocos reportes conocidos del análisis del perfil de compuestos fenólicos. Los resultados encontrados sugieren un alto nivel de compuestos fenólicos solubles (nivel mayor que el del frijol y el de algunas frutas, por ejemplo). Los principales compuestos fenólicos cuantificados por HPLC fueron el ácido ferúlico (258 mg/100 g bs), ácido 4-hidroxibenzoico (174 mg/100 g bs), ácido siríngico (156 mg/100 g bs), y ácido protocatecúico (93 mg/100 g bs). Hacen falta estudios más profundos sobre estos fenólicos solubles, así como de los fenólicos insolubles (melaninas y compuestos similares) del huitlacoche, ninguno de los cuales nunca han sido explorados en cuanto a sus posibles propiedades nutraceuticas (**Beas-Fernández y col., 2008; Beas-Fernández y col., 2006**). En congruencia con los niveles de fenólicos encontrados, los extractos metanólicos de huitlacoche han mostraron poseer actividades antirradical (antioxidantes del DPPH) del 57-74%, e inhibieron 16-49% la mutagenicidad del 2-aminoantraceno hacia cepas de *Salmonella typhimurium*, además de haberse confirmado ausencia de mutagenicidad y promutagenicidad en los extractos metanólicos de huitlacoche (**Guevara-Lara y col., 2008; Beas-Fernández y col., 2008; Carrillo-Díaz y col., 2008**).

2. 8. Melaninas

De hecho, la melanina no es una sola sustancia. Más bien las melaninas son un gran grupo de sustancias diversas todas con propiedades similares. En el pasado las melaninas fueron simplemente definidas por su resistencia relativa a la degradación por ácidos calientes, soluciones alcalinas concentradas calientes y el blanqueamiento por agentes oxidantes fuertes. Hoy en día, técnicas más sofisticadas, tales como la resonancia del espín del electrón, son usadas para definir a las melaninas. Sin embargo, como resultado de su gran tamaño, insolubilidad en solventes orgánicos y acuosos y heterogeneidad, no han sido resueltas las estructuras completas de las melaninas que ocurren naturalmente. En general, las melaninas son macromoléculas formadas por polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos. Comúnmente los pigmentos resultantes son marrones o negros en color pero muchos otros colores han también sido observados. Las melaninas son también hidrofóbicas y cargadas negativamente. En

diversos hongos se han identificado varios tipos diferentes de melaninas a la fecha. Los dos más importantes tipos son la melanina DHN (llamada así por una de las rutas intermediarias, 1, 8-dihidroxi-naftaleno) y melanina DOPA (llamada así por uno de los precursores, L-3, 4-dihidroxifenilalanina). Ambos tipos de melaninas han sido implicadas en la patogénesis **(Langfelder y col., 2003)**. La mayoría de las melaninas fúngicas se derivan de la molécula precursora 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN); la ruta biosintética por la cual se suministran las DHN ha sido denominada ruta policétida y se encuentra principalmente en ascomicetos y emparentada con deuteromicetos **(Jacobson, 2000)**.

Las melaninas se encuentran en las paredes celulares de las hifas, y en otras en las paredes celulares de las esporas o esclerocios. Las melaninas permiten la resistencia o hibernación de las estructuras de resistencia fúngicas mediante la protección contra una variedad de factores ambientales como el ataque de enzimas líticas producidas por microorganismos del suelo, o protegerlas contra la desecación y la radiación de la luz visible y ultravioleta. Los hongos melanizados son más resistentes a factores más que aquellos mutantes albinos no melanizados u otros hongos normales no melanizados **(Butler y col., 2005)**. Además, mientras no todos los hongos patógenos producen melaninas, existe una gran clase de hongos potencialmente invasivos los cuales tienen en común la producción de melaninas **(Jacobson, 2000)**. Las melaninas DHN son las estudiadas más extensamente de las melaninas fúngicas, principalmente debido a que ellas tienen un papel esencial en la penetración del apresorio **(Butler y col., 2005)**.

Los productos de la oxidación quinónica precursores de las melaninas tienen una alta reactividad y capacidad tóxica, y es de esperarse que estos puedan ser secretados por los hongos melanínicos para causar daño a los huéspedes **(Jacobson, 2000)**.

Existe evidencia que las estructuras melanizadas estabilizan radicales libres en los sistemas biológicos, esto debido a su gran nivel de resonancia de electrones, lo cual sugiere que la melanina representa una trampa para electrones desapareados. Este fenómeno fue interpretado por la evidencia de tres estados de oxidación de los residuos quinónicos de la melanina: hidroquinona (estado totalmente reducido), semiquinona (radical libre estable y parcialmente oxidado), y quinona (producto de la oxidación de dos electrones). Las semiquinonas son conocidas por ser radicales libres estables, y dado que la melanina polimérica contiene una amplia estructura aromática conjugada, esto sugiere que la energía del radical libre semiquinona de la melanina sería reducida por la

posibilidad de resonancia. Así, la melanina podría funcionar como un lavado para electrones desapareados potencialmente dañinos **(Jacobson, 2000)**.

Las melaninas tienen un papel en la resistencia a altas temperaturas. Las bases para esta protección no están del todo entendidas. Podría ser que las melaninas atrapan radicales libres de oxígeno tóxicos los cuales son generados de la membrana celular como resultado del calentamiento. Una explicación alternativa para el efecto de protección podría estar relacionada al entrecruzamiento de la pared celular por la melanina **(Jacobson, 2000)**.

La melanina se puede unir a varios metales de transición. La utilidad de esta unión ha sido interpretada de varias formas, como un decremento en las concentraciones de metales libres, en el caso de metales tóxicos, y creando un depósito adyacente a la célula, en el caso de metales esenciales. En este papel de intercambiador de electrones, la melanina puede reducir u oxidar metales y puede facilitar o inhibir la transferencia de un electrón, conduciendo a la formación de un radical libre, dependiendo de si éste se une al metal efectivamente **(Jacobson, 2000)**.

La estructura de las melaninas es deducida a través de análisis cromatográficos y electroforéticos de los productos de su degradación reductiva y oxidativa. Debido a la gran dificultad de estos trabajos, pocas melaninas han sido analizadas estructuralmente **(Jacobson, 2000)**.

2. 8. 1. Propiedades Funcionales y Bioactivas de las Melaninas

Ya que las melaninas tienen propiedades radioprotectivas y antioxidantes, son adsorbentes de radionucleidos y metales pesados y pueden proteger efectivamente a los organismos vivos de la radiación ultravioleta, ellas son usadas en medicina, farmacología, cosméticos y otros campos **(Aghajanyan y col., 2005)**.

Por otro lado, existe un creciente interés en el desarrollo de aditivos naturales para el uso en la industria de los alimentos, el cual ha estado alentado por una fuerte demanda del consumidor por productos naturales. Esta tendencia incluye un considerable interés en obtener colorantes de alimentos de recursos naturales. Los colorantes naturales se han vuelto crecientemente populares entre los consumidores debido a que los colorantes sintéticos son frecuentemente percibidos como indeseables o dañinos. Algunos colorantes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sintéticos han sido culpados de reacciones de intolerancia y alérgicas. La preferencia de los consumidores por los colorantes derivados naturalmente es asociada con la imagen de una vida saludable y un estilo de vida de calidad. En animales y plantas la coloración de semillas, bayas, flores, piel humana, o cabello es especialmente debido a melanina **(Wang y col., 2006)**. Este fenómeno de coloración también puede ser observado en los hongos, un caso muy especial es el huitlacoche (*Ustilago maydis*) el cual tiene un muy sobresaliente color negro en sus cuerpos fructíferos, coloración la cual pueda también ser atribuible a la melanina. De esta forma los hongos también pueden ser fuente de colorantes naturales como las melaninas.

Estudios previos han mostrado que los pigmentos melanínicos extraídos de varios recursos, incluidas plantas, animales, y microorganismos, exhiben algunas propiedades físicas y químicas comunes. Estas propiedades comunes incluyen alto peso molecular, insolubilidad en agua, ácidos acuosos y solventes orgánicos comunes, decoloración por agentes oxidantes (KMnO_4 , NaOCl , y H_2O_2), capacidad de quelación de metales y una fuerte capacidad de absorción UV-Vis. También las melaninas naturales muestran un amplio rango de actividades bioquímicas, incluyendo fotoprotección, antioxidación, atrapamiento de radicales libres y efectos inmunomoduladores **(Tu y col., 2009)**.

Estas propiedades de la melanina son de gran interés debido a las implicaciones para el mantenimiento de la salud y producción de alimentos funcionales (nutracéuticos). La participación de las melaninas en reacciones de radicales libres ha sido ampliamente reportada. Ha sido encontrado que las propiedades de secuestro o quelantes de las melaninas están principalmente involucradas en su actividad antioxidante. Estas propiedades pueden ser utilizadas en el estado de iniciación de reacciones en cadena por captura de metales de transición o inactivación de radicales superóxido. Sin embargo, los atrapadores de radicales libres no son efectivos en la prevención de la propagación de las reacciones en cadena debido a su incapacidad para reaccionar con radicales peróxido. No obstante, la fuerte actividad antioxidante de las melaninas indica que es probablemente capaz de detener la propagación de la reacción en cadena **(Hung y col., 2002)**.

Hung y col. (2002) examinaron la actividad antioxidante de las melaninas derivadas de hojas de té. En presencia de las melaninas del té, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad exhibió una fase lag distinta, probablemente debido a la terminación de la propagación de las reacciones en cadena. Adicionalmente, se encontró que la actividad

antioxidante de la melanina depende de su estado de oxidación. La posibilidad de la melanina de existir en varios grados de oxidación es una de sus propiedades fundamentales. Ésta es causada por la estructura melanínica fenol-quinona.

Otro ejemplo de actividad antioxidante de las melaninas en alimentos es la gallina sedosa de hueso negro (*Gallus gallus domesticus* Brisson), conocida como una maravilla de la medicina tradicional China. Adquirió este nombre debido a su plumaje blanco-nieve sedoso pero su piel, carne y huesos negros. En los países de Asia, la gallina sedosa no sólo es considerada medicina conocida como “el ave fénix blanca”, sino también un alimento popular saludable usado como un reforzador inmune y un protector contra la demacración y la debilidad. Mientras se buscaba por una explicación para las consideradas bondades medicinales del ave, varios aspectos habían sido considerados como contribuyentes, incluyendo contenidos de antioxidantes y perfiles de aminoácidos/péptidos. En la gallina sedosa, las melaninas son sintetizadas *de novo* en los melanocitos, los cuales están ampliamente distribuidos en el músculo, la superficie del hueso, tráquea, mesenterio, canales digestivos, ovarios, testículos y otros tejidos. Considerando esta amplia distribución de la melanina, se cuestionó si la melanina de la gallina sedosa (melanina SF), un pigmento natural, podría ser en parte responsable (Chen y col., 2008). Esto después fue confirmado por Tu y col. (2009), quienes encontraron que las melaninas procedentes de esta ave tienen una fuerte actividad antioxidante mediante análisis de actividad antioxidante por el radical DPPH, radical superóxido y ensayo de peroxidación lipídica.

Por último, se ha mencionado que las propiedades inmunofarmacológicas de las melaninas son de gran interés debido a que puede servir como un promisorio tratamiento para el SIDA (Wang y col., 2006).

2. 9 Métodos Analíticos para la Evaluación de Compuestos Fenólicos Totales y Capacidad Antioxidante

Un antioxidante es definido como una molécula capaz de detener o prevenir la oxidación de otras moléculas, mientras que un antioxidante biológico ha sido definido como “cualquier sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones comparada con aquellas de un sustrato oxidable, significativamente retarda o previene la oxidación de ese

sustrato". Es bien conocido que la oxidación daña varias sustancias biológicas y subsecuentemente causa muchas enfermedades. En consecuencia, existen varias revisiones sobre la relación entre daño oxidativo y varias enfermedades incluyendo cáncer, enfermedad hepática, Alzheimer, envejecimiento, artritis, inflamación, diabetes, Parkinson, aterosclerosis, y SIDA **(Moon y Shibamoto, 2009)**. Por otro lado, según numerosos estudios epidemiológicos, los antioxidantes de los alimentos parecen estar estrechamente relacionados a la prevención de varias patologías, incluyendo diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, y desordenes relacionados con el envejecimiento **(Tabart y col., 2009)**. Los antioxidantes fenólicos, un grupo específico de metabolitos secundarios, desempeñan un papel muy importante en la protección del organismo contra los efectos dañinos de los radicales de oxígeno y otras especies de oxígeno altamente reactivas **(Stratil y col., 2006)**.

Por lo anterior, la medición de capacidad antioxidante de los productos alimenticios es un tema de creciente interés. Varios estudios *in vitro* han sido conducidos para evaluar la capacidad antioxidante total de los productos alimenticios. Hasta ahora, sin embargo, no existe un método estandarizado oficial, y por lo tanto es recomendado que cada evaluación deba hacerse con varias condiciones de oxidación y diferentes métodos de medición **(Zulueta y col., 2009)**. De esta manera, en nuestro estudio sobre los hongos comestibles huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*, se evaluó la cantidad de compuestos fenólicos totales (antioxidantes) por el reactivo de Folin-Ciocalteu, y la capacidad antioxidante por dos metodologías distintas, TEAC-DPPH y ORAC.

2. 9. 1. Compuesto Fenólicos Totales por Folin-Ciocalteu

El método Folin-Ciocalteu se basa en una reacción de transferencia de un solo electrón y ha sido usada normalmente para estimar el contenido de fenoles en los alimentos **(Jimenez-Alvarez y col., 2008)**. El método original fue desarrollado en 1927 a partir de los reactivos químicos usados para el análisis de tirosina, en el cual la oxidación de los fenoles por el reactivo molibdotungstato da un producto coloreado con una λ_{\max} de 745 – 750 nm **(Prior y col., 2005)**.

El método ha sido mejorado con un reactivo heteropolianión molibdotungstosfosforico que reduce los fenoles más específicamente **(Prior y col., 2005)**. El reactivo reacciona con los fenoles para formar cromógenos que pueden ser detectados espectrofotométricamente. El

desarrollo del color es debido a la transferencia de electrones a pH básico para reducir los complejos ácido fosfomolibdico/fosfotungstico para formar cromógenos (**Sigma-Aldrich**).

El ensayo de Folin-Ciocalteu es simple, rápido y robusto y no requiere de equipo especializado. Un inconveniente del método es que agentes reductores como el ácido ascórbico pueden interferir en el análisis y así sobrestimar el contenido de compuestos fenólicos (**Jimenez-Alvarez y col., 2008**).

2. 9. 2. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox con el Radical DPPH (TEAC-DPPH)

El radical DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidrazil) es uno de los pocos radicales orgánicos de nitrógeno estables, el cual lleva un color púrpura profundo. Éste se encuentra comercialmente disponible y no tiene que ser generado antes del ensayo como en el caso del radical ABTS (**Prior y col., 2005**).

Recientemente, el ensayo del DPPH se ha vuelto completamente popular en los estudios de antioxidantes naturales. Una de las razones es que este método es simple y altamente sensible. El ensayo se basa en la teoría de que un donador de hidrógeno es un antioxidante. El efecto antioxidante es proporcional a la desaparición del DPPH en las muestras probadas. Han sido reportados varios métodos para monitorear la cantidad de DPPH en los sistemas de prueba antioxidante: resonancia de espín del electrón (ESR), resonancia magnética nuclear (NMR), y espectrofotometría UV-visible. Sin embargo, recientemente el monitoreo del DPPH con un espectrofotómetro de UV-visible se ha vuelto el método más amplia y comúnmente usado debido a su simplicidad y precisión. El DPPH muestra un máximo de absorción a 517 nm (púrpura). El color se torna de púrpura a amarillo después de que el DPPH absorbe un hidrógeno procedente de un antioxidante. Esta reacción es estequiométrica con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos. Por lo tanto, el efecto antioxidante puede ser fácilmente evaluado siguiendo el decremento de la absorbancia (**Moon y Shibamoto, 2009**).

Para estandarizar los resultados de varios estudios, ha sido utilizada la unidad equivalentes de Trolox (ET). El Trolox es un derivado hidrosoluble comercial de la vitamina E, que posee capacidad antioxidante y con el cual se construyen curvas de calibración. Así, la capacidad antioxidante de una muestra es expresada en términos de

micromoles equivalentes a Trolox (ET) por unidad de muestra (litro, mililitro, gramo, 100 gramos, etc.) **(Moon y Shibamoto, 2009)**.

Recientemente, casi el 90% de los estudios de antioxidantes usan el ensayo del DPPH combinado con otros ensayos **(Moon y Shibamoto, 2009)**.

2. 9. 3. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Inicialmente, el método ORAC consistía en la medición del decremento en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando ésta sufría daño oxidativo causado por una fuente de radicales peroxil (ROO·). El método media la habilidad de los antioxidantes en la muestra para proteger a la proteína del daño oxidativo. La proteína usada en el método original fue la β -ficoeritrina, pero ésta presentaba una serie de desventajas, como la inconsistencia entre lotes, fotosensibilidad e interacción con compuestos fenólicos debido a la unión no específica a proteínas **(Zulueta y col., 2009)**. Para resolver estos problemas las sondas fluorescentes que actualmente se usan son la fluoresceína (3', 6'-Dihidroxispiro [isobenzofuran – 1[3H], 9' [9H]- xanten]-3-ona) o la diclorofluoresceína (2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), las cuales son más estables y menos reactivas **(Prior y col., 2005)**.

En el ensayo ORAC, los radicales peroxil generados artificialmente reaccionan con la fluoresceína. Conforme la reacción progresa la fluoresceína es consumida y la fluorescencia decrece. En presencia de un antioxidante toma lugar una reacción competitiva entre la sonda fluorescente y el antioxidante, retardando el consumo de la fluoresceína. Así, la capacidad antioxidante puede ser calculada por la diferencia en el área bajo la curva (ABC) entre el blanco y la muestra **(Jimenez-Alvarez y col., 2008)**.

Los valores de ORAC son usualmente reportados como equivalentes de Trolox (ET). Una curva de calibración es generada usando el ABC de cinco concentraciones estándar de Trolox, y los equivalentes de Trolox de la muestra son calculados usando relaciones lineares o cuadráticas entre la concentración de Trolox y el área neta bajo la curva de la descomposición de la fluoresceína (ABC muestra – ABC blanco). Los datos son expresados como micromoles de equivalentes de Trolox (ET) por unidad de muestra (litro, mililitro, gramo, 100 gramos, etc.) **(Prior y col., 2005)**.

El ensayo ORAC ha sido usado para el estudio de la capacidad antioxidante de muchos compuestos y muestras de alimentos. La industria ha aceptado el método al grado de que algunos productores de nutraceuticos están empezando a incluir valores ORAC en las etiquetas de sus productos **(Prior y col., 2005)**.



3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Tal como se plasma en el marco teórico, los hongos, así como su cultivo y comercio, es una industria creciente de gran importancia. Los hongos son consumidos por el ser humano principalmente por sus características sensoriales; sin embargo por otro lado, los hongos tienen un muy buen contenido de nutrientes que podría complementar la dieta de personas que viven en países en desarrollo y su base dietaria son los cereales y alimentos de origen vegetal. Aunque los dos aspectos tratados anteriormente son importantes, existe otro, este aspecto es el de sus propiedades funcionales o biológicamente activas. Aunque el aspecto anteriormente mencionado tendría gran impacto en la industria de los hongos, también habría un gran impacto positivo en la investigación química, bioquímica, farmacológica y molecular de los hongos.

En el caso especial del huitlacoche (*Ustilago maydis*) el panorama anterior se refleja completamente. La industria de este hongo se encuentra en una tendencia actual de desarrollo, sus propiedades sensoriales y nutritivas son especiales y de gran interés; sin embargo, por otro lado, sus propiedades nutraceuticas y biológicamente activas no han sido investigadas en una forma extensa y bien determinadas. Por lo tanto es justificable la investigación de los compuestos fenólicos tanto solubles como insolubles (melaninas) de este hongo, así como todo tipo de investigación relacionada con este organismo.

En el caso del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*), aunque ha sido un hongo más extensamente investigado y su industria está bien establecida, es justificable la intervención de éste en la investigación ya que servirán como referencia del potencial nutraceutico del huitlacoche.

4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Los hongos comestibles huitlacoche (*Ustilago maydis*) y setas (*Pleurotus ostreatus*) poseen compuestos fenólicos tanto solubles como insolubles (melaninas) como componentes importantes, que le confieren un valor como alimento nutraceutico.

5. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

5. 1. Objetivo General

Analizar cuantitativamente los compuestos fenólicos de los hongos comestibles huitlacoche (*Ustilago maydis*) y setas (*Pleurotus ostreatus*) y evaluar algunas de sus posibles propiedades nutraceuticas.

5. 2. Objetivos Particulares

- 1.- Implementar metodologías de extracción de compuestos fenólicos solubles e insolubles (melaninas) para obtener extractos ricos en compuestos fenólicos de los hongos comestibles huitlacoche (*Ustilago maydis*) y de las setas (*Pleurotus ostreatus*).
- 2.- Implementar una metodología rápida para analizar cuantitativamente los compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos de los hongos huitlacoche (*Ustilago maydis*) y de las setas (*Pleurotus ostreatus*).
- 3.- Evaluar algunas de las posibles propiedades nutraceuticas de los extractos obtenidos del huitlacoche (*Ustilago maydis*) y de las setas (*Pleurotus ostreatus*).

6. METAS

- Obtener extractos ricos en compuestos fenólicos tanto solubles como insolubles (melaninas) de los hongos huitlacoche (*Ustilago maydis*) y de las setas (*Pleurotus ostreatus*).
- Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos de ambos hongos.
- Realizar la evaluación de las propiedades nutraceuticas (antioxidante y capacidad de inducir motilidad intestinal) de los extractos obtenidos de ambos hongos.

7. METODOLOGÍA

7. 1. Obtención de las Muestras de Huitlacoche (*Ustilago maydis*) y Setas (*Pleurotus ostreatus*) Comestibles

Se obtuvieron muestras comerciales de huitlacoche (*Ustilago maydis*); éstas fueron adquiridas en el Centro Comercial Agropecuario de la ciudad de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

En cuanto a las muestras de setas comestibles (*Pleurotus ostreatus*), éstas fueron obtenidas estableciendo un protocolo de cultivo a partir de micelio del hongo con el que ya se contaba en el laboratorio. Tal protocolo de cultivo se basó principalmente en el descrito por **Martínez y col. (2001)**. En primer lugar, el hongo con el que ya se contaba en el laboratorio fue resembrado en varias cajas con medio agar papa-dextrosa (PDA) con el fin de tener suficiente cantidad de inóculo para los pasos siguientes. Posteriormente se adquirieron semillas de trigo entero las cuales fueron limpiadas, remojadas durante 12 h y después esterilizadas (autoclave durante 30 min a 15 psi de presión) en botes plásticos de 1 litro. Una vez con el trigo esterilizado fue inoculado el hongo proveniente de las cajas previamente resembradas, lo anterior en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar (Lúmina, V-160) con el fin de evitar la contaminación por otro tipo de organismos; la inoculación se llevó a cabo cortando trozos de medio de cultivo junto con el hongo y colocándolos dentro de los mismos botes plásticos con el trigo esterilizado. Una vez que todos los botes fueron inoculados se almacenaron en gavetas para proporcionarles condiciones de oscuridad aptas para el crecimiento del micelio del hongo, los botes fueron cerrados con sus tapaderas y con papel aluminio para asegurar que no existiera contaminación por parte de otro tipo de organismos. Veinticinco días después de la inoculación del trigo, el micelio del hongo estaba lo suficientemente crecido para continuar con los pasos siguientes.

Para los pasos posteriores se adquirió rastrojo de maíz como siguiente sustrato para el crecimiento y fructificación del hongo; el rastrojo fue colocado en paquetes fabricados con gasa con el fin de tener un mejor manejo del rastrojo durante el proceso de pasteurización. Para la pasteurización del rastrojo se utilizó una solución de cal al 0.5% la cual fue colocada en una olla grande tapando totalmente los paquetes de rastrojo; una vez que los paquetes estaban totalmente cubiertos por la solución se procedió a un

calentamiento durante 40 min a 80 °C; el proceso anteriormente descrito tenía como objetivo el evitar la contaminación del sustrato donde crecería y fructificaría el hongo. Posterior al proceso de pasteurización el rastrojo era escurrido y extendido sobre la mesa del laboratorio para permitir su enfriamiento y eliminación de la humedad extra que pudiera contener. Una vez que el rastrojo pasteurizado se enfriaba (a temperatura ambiente) se inoculaba con los botes de trigo invadido por el hongo, esparciendo el contenido a lo largo del rastrojo extendido sobre la mesa y después mezclando ambos sustratos hasta homogenizar ambos materiales. Una vez hecha la mezcla, ésta fue empaquetada en bolsas de plástico y los paquetes trasladados a un área adaptada para el crecimiento y fructificación del hongo. El área adaptada para el crecimiento y fructificación del hongo tenía como características una temperatura templada (23-26°C), una iluminación tipo penumbra (casi en oscuridad) y una buena ventilación, tales condiciones tratando de asemejar lo más posible las que se encuentran donde crecen este tipo de hongos de forma natural. Después de 4 días de crecimiento del hongo se realizaron una serie de pequeñas perforaciones en las bolsas con el fin de mejorar el intercambio gaseoso del hongo, tales perforaciones fueron 80 por bolsa y de una distribución uniforme. Una vez realizadas las perforaciones se dejó crecer al hongo sin ninguna modificación, sólo revisiones continuas con el fin de detectar posibles contaminaciones. Una vez que las bolsas se encontraban totalmente invadidas por el micelio del hongo se procedió a inducir su fructificación; para tal fin, las bolsas se volvieron a perforar pero ésta vez con orificios mucho más grandes por donde pudieran surgir los cuerpos fructíferos del hongo, por otro lado se proporcionó un ambiente de alta humedad. El ambiente húmedo se lograba con riegos de 2 a 3 veces al día con un aspersor utilizado para fumigación, también el área fue acordonada con pliegos de plástico y costales los cuales permitían que la humedad se mantuviera durante más tiempo; el riego se realizaba hacia las paredes y los costados de donde se encontraban los paquetes y no directamente hacia ellos, lo anterior debido a que la fuerza del chorro podía lastimar los cuerpos fructíferos ya surgidos o inundar las bolsas matando al hongo. Una vez que los cuerpos fructíferos se encontraban en su estado óptimo de maduración (lo más grande posible antes de que los bordes comiencen a doblarse hacia arriba) eran cosechados utilizando un bisturí y cortando desde el tallo. Los cuerpos fructíferos posteriormente eran colocados en refrigeración hasta su traslado al laboratorio para el procesamiento de la muestra.

El cultivo se mantuvo hasta que se tenían la cantidad de muestra necesaria para los experimentos que se realizarían posteriormente.

7. 2. Preparación de las Muestras para Análisis Posteriores

Tanto el huitlacoche como las setas comestibles fueron limpiados de materiales extraños y almacenados en congelación (-70 °C) (Ultra-congelador, Environmental Equipment Cincinnati, modelo U85-22) hasta que fueron liofilizados (Labconco modelo Freezone 4.5; Virtis modelo 620L 3150 0C). El material de cada hongo liofilizado fue triturado en un molino de café y especias (Krupps, modelo GX410011), y almacenado herméticamente bajo congelación a -20 °C (General Electric, modelo FCM 155PD WH) hasta que se realizaron las extracciones y análisis posteriores.

Una vez con el material liofilizado se le determinó el porcentaje de humedad con el fin de expresar los resultados en base seca. Para tal proceso, alrededor de 1 g (Ohaus, modelo Explorer Pro 214C) de muestra fue puesta en el horno de secado (Terlab) a 105 °C hasta alcanzar el peso constante y determinar el porcentaje de humedad por diferencia, lo anterior se realizó por triplicado.

7. 3. Obtención de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles

7. 3. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

Para la extracción de compuestos fenólicos solubles se utilizó como base el trabajo descrito por **Lee y col. (2007)**. Las extracciones se llevaron a cabo utilizando una cantidad de muestra de hongo liofilizado de 5 g (Adam, modelo PW124) para cada extracción y se utilizaron cuatro sistemas de extracción: etanol al 95%, metanol al 95%, agua fría y caliente.

Para las extracciones etanólicas, metanólicas y acuosas frías la muestra se colocó con 50 mL del solvente correspondiente y bajo agitación (Barnstead, modelo 2309) durante 24 h a temperatura ambiente, una vez completado el tiempo la mezcla fue centrifugada (Sorvall Instruments, modelo RC-5B) a 10,000 r.p.m. durante 20 min. El sobrenadante y el precipitado fueron separados por decantación, el sobrenadante fue almacenado en

refrigeración y al precipitado se le repitió la extracción un par de veces más. Al final se mezclaron los tres sobrenadantes (extractos) y fueron centrifugados (10,000 r.p.m. durante 20 min) y filtrados (Ahlstrom, No. Cat. 0540-1100) con la finalidad de separar los restos de muestra que pudiera contener el extracto. En el caso de las extracciones metanólicas y etanólicas, los extractos fueron rotovaporados (Rotovapor y baño de agua marca Ika, modelo RV10 digital, HB10 digital. Bomba de vacío marca Ilmvac, modelo MPC 301 Zp) y resuspendidos en agua para finalmente ser liofilizados (Virtis, modelo 620L 3150 0C) y de nuevo disueltos en el agente de extracción obteniéndose un extracto concentrado a 50 mg/mL. En el caso del extracto acuoso frío, éste fue directamente liofilizado y redisolto en agua a la misma concentración de 50 mg/mL.

Para el extracto acuoso caliente la muestra fue colocada con 50 mL de agua en ebullición y la mezcla mantenida en estas condiciones durante 10 min con agitación (Cimarec, modelo SP131325). Una vez terminado el tiempo, la mezcla se dejó enfriar y fue centrifugada a 10,000 r.p.m. durante 20 min. El sobrenadante y el precipitado fueron separados por decantación, el sobrenadante fue almacenado y al precipitado se le repitió la misma extracción un par de veces. Al final se mezclaron los tres sobrenadantes (extractos) y fueron centrifugados (10,000 r.p.m. durante 20 min) y filtrados con el fin de separar los restos de muestra que pudiera contener el extracto. Al igual que el extracto acuoso frío, éste fue liofilizado y redisolto en agua a una concentración de 50 mg/mL.

Todos los extractos fueron almacenados en congelación y bajo protección de la luz hasta los análisis posteriores. Todas las extracciones fueron realizadas por triplicado.

7. 3. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

La obtención de extractos de compuestos fenólicos insolubles (melanina) se basó en el método descrito por **Harki y col. (1997)**. Tal extracción se realizó utilizando 5 g del hongo liofilizado. La muestra fue mezclada con 50 mL de KOH 1 M y colocada bajo reflujo durante 5 h bajo atmósfera de nitrógeno. El producto obtenido fue centrifugado a 10,000 r.p.m. durante 20 min y el sobrenadante acidificado a un pH de 2 con el fin de precipitar la melanina, por otro lado el precipitado fue sometido a reflujo bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas un par de veces más. El sobrenadante acidificado a un pH de 2 fue centrifugado a 10,000 r.p.m. por 10 min con el fin de obtener el precipitado. Tal precipitado es llamado “melanina cruda” y fue sometido a varios lavados con agua

destilada. Se realizaron 3 lavados, con 40 mL de agua destilada cada uno y agitando en vortex (Scientific Industries, modelo G560), posteriormente se centrifugó a 10,000 r.p.m. 20, 15 y 10 min separando el agua del lavado. Una vez realizados los 3 lavados, el pellet de “melanina cruda” fue homogenizado con 1 mL de agua destilada y pasado a tubos de microcentrífuga para un mejor manejo del pellet, los tubos fueron centrifugados (10,000 r.p.m. durante 15 min) (Clay Adams, modelo micro 2000) y el agua separada. El pellet fue colocado en el desecador para su deshidratación bajo atmósfera de nitrógeno. Lo anterior también se realizó para los productos de reflujar por segunda y tercera vez el precipitado del primer reflujado.

Los pellets de “melanina cruda” ya secos fueron posteriormente sometidos a una hidrólisis ácida como parte del protocolo de purificación. Para esto, la “melanina cruda” fue colocada en un matraz con 10 mL de HCl 7 M y calentada (Cimarec, modelo SP131325) a 100 °C durante 2 h sin permitir que disminuyera la cantidad de HCl por evaporación. Lo anterior se realizó en una campana extractora (Alder) para evitar riesgos por la evaporación del HCl. Terminada la hidrólisis ácida se separó el residuo o “melanina no hidrolizable” mediante centrifugación a 12,000 r.p.m. durante 20 min; tal melanina fue sometida a varios lavados con HCl 0.01 M y agua destilada. En total se realizó 1 lavado con HCl 0.01 M y 2 con agua destilada separando la “melanina no hidrolizable” mediante centrifugación a 12,000 r.p.m. durante 20 min. Por último, se realizó una suspensión con agua destilada de la “melanina no hidrolizable” y se pasó a tubos de microcentrífuga que fueron centrifugados a 14,000 r.p.m. durante 10 min para precipitarla y separar el agua, quedando la melanina en los tubos para un mejor manejo. Posteriormente, la “melanina no hidrolizable” fue secada en desecador bajo atmósfera de nitrógeno.

Una vez que la “melanina no hidrolizable” se encontraba seca, se procedió a aplicarle otro proceso de purificación mediante lavados con cloroformo. Para lo anterior, “la melanina no hidrolizable” fue redisuelta en 7.5 mL de KOH 1 M y posteriormente se le agregaron 2.5 mL de cloroformo y 0.3 mL de 1-butanol; la mezcla fue agitada en vortex durante 30 min bajo atmósfera de nitrógeno y posteriormente centrifugada (Clay Adams, modelo micro 2000) a 14,000 r.p.m. durante 20 min. La fase de cloroformo fue separada y se repitieron las operaciones un par de veces a la solución alcalina de melanina. Por último, la melanina fue precipitada por acidificación y lavada con agua destilada. La acidificación se realizó con HCl 7 M y el precipitado se separó mediante centrifugación (Sorvall

Instrumentos, modelo RC-5B) a 16,000 r.p.m. durante 20 min, de la misma forma se separó el agua de los lavados. Al final, la melanina ya purificada se colocó en tubos de microcentrífuga y fue puesta a secar en desecador bajo atmósfera de nitrógeno; estas condiciones se mantuvieron para conservar la “melanina purificada”.

El proceso de extracción de melanina dio como resultado residuos o fracciones los cuales fueron almacenados para posteriormente ser analizados en cuanto a sus compuestos fenólicos y capacidad antioxidante por el método TEAC-DPPH. Los residuos o fracciones que se produjeron son los siguientes:

Digestión Alcalina:

- Sobrenadante obtenido de la precipitación de la “melanina cruda”.
- Agua de los lavados de la “melanina cruda”.

Hidrólisis Ácida:

- HCl 7 M utilizado en la hidrólisis ácida de la “melanina cruda”.
- HCl 0.01 M utilizado en los lavados de la “melanina no hidrolizable”.
- Agua utilizada en los lavados de la “melanina no hidrolizable”.

Lavados con Cloroformo:

- Cloroformo obtenido de los lavados.
- Sobrenadante (HCl 7 M) obtenido al precipitar la melanina de la solución alcalina de melanina.
- Agua de los lavados de la melanina.

La extracción de melanina se realizó por duplicado y solo en el huitlacoche ya que era evidente la presencia de estos compuestos.

7. 4. Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales

7. 4. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

La cuantificación de los compuestos fenólicos de los extractos etanólicos, metanólicos, acuosos fríos y calientes obtenidos del huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* se realizó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, según la metodología usada por **Lee y col. (2007)** con algunas modificaciones. A 2 mL de una solución acuosa al 2% de carbonato de sodio se le agregaron 100 μ L de los extractos obtenidos. 2 min después se agregaron 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%. Después de 30 min de incubación en la oscuridad, fue medida la absorbancia a 750 nm contra un blanco (Thermo Scientific, modelo BIOMATE 3). El blanco contenía todos los reactivos a excepción del extracto, en lugar de éste se colocaron 100 μ L del agente de extracción en el que se encontraba disuelto el extracto. El contenido de fenoles totales fue expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG/g muestra base seca) y fue calculado en base a una curva de calibración de ácido gálico disuelto en el agente de extracción en cuestión. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7. 4. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

La cuantificación de compuestos fenólicos presentes en la melanina extraída de huitlacoche, así como en la melanina sintética, se realizó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu según la metodología usada por **Lee y col. (2007)** con algunas modificaciones. Primero, se prepararon soluciones de la melanina extraída así como de la melanina sintética usada como estándar. Para preparar las soluciones de melanina se pesaron 2 mg de cada muestra de melanina (sintética, extracción 1 y extracción 2). Posteriormente, cada muestra fue triturada en mortero y en este mismo se agregaron 5 mL de KOH 2 M homogenizando la mezcla. Con una pipeta Pasteur, se colocó la mezcla en un vaso de precipitados y se procedió a calentar con agitación (Cimarec, modelo SP131325) hasta que fue disuelta la melanina. No fue posible disolver toda la melanina, por lo tanto, se procedió a centrifugar (Clay Adams, modelo micro 2000) las soluciones y separar el precipitado, éste fue lavado con HCl 1 M y agua destilada, y posteriormente fue puesto a secar en desecador para por diferencia conocer la cantidad de melanina disuelta. En cuanto a la solución de melanina, se procedió a realizar la cuantificación de compuestos fenólicos. A 2 mL de una solución acuosa al 2% de carbonato de sodio se le agregaron

100 μ L de las soluciones de melanina preparadas. 2 min después se agregaron 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%. Después de 20 min de incubación en la oscuridad, la mezcla de reacción fue colocada en tubos de microcentrífuga ámbar y centrifugada a 14,000 r.p.m. durante 10 min, con el fin de eliminar el precipitado formado. Una vez terminada la centrifugación fue medida la absorbancia del sobrenadante a 750 nm contra un blanco. El blanco contenía todos los reactivos a excepción de la solución de melanina, en lugar de ésta se colocaron 100 μ L de KOH 2 M utilizado para disolver la melanina. El contenido de fenoles totales fue expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico procedentes de melanina por gramo de muestra en base seca, miligramos equivalentes de ácido gálico por miligramo de melanina extraída y miligramos equivalentes de ácido gálico por miligramo de melanina soluble (mg EAG procedentes de melanina/g muestra base seca, mg EAG/mg de melanina extraída y mg EAG/mg de melanina soluble), lo anterior fue calculado en base a una curva de calibración de ácido gálico disuelto en KOH 2 M. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

También fueron cuantificados los compuestos fenólicos presentes en los residuos de la extracción de melanina, lo anterior se realizó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu según la metodología usada por **Lee y col. (2007)** con algunas modificaciones. Antes de las determinaciones, los residuos fueron preparados para su análisis ya que éstos se encontraban disueltos en solventes distintos. Primero, fue medido el volumen total del residuo con el fin de tener los datos suficientes para los cálculos posteriores. Luego se tomó una alícuota de volumen conocido con la cual se trabajaría. A cada alícuota se le neutralizó el pH (Denver Instrument modelo UP-25, Hanna Instruments modelo HI 8314) llevándolo a 7 con HCl o KOH según correspondiera, esto se realizó con todos los residuos a excepción del cloroformo, el cual se colocó en una campana extractora para que el solvente se evaporara y el residuo quedara seco. Una vez que los residuos tenían un pH de 7, se procedió a rotovapoar a sequedad. Ya secos, los residuos fueron disueltos en KOH 2 M ya que se conocía de antemano que todos eran solubles en ese solvente. Los residuos fueron disueltos a los volúmenes de las alícuotas tomadas o más, si existía la necesidad de aplicar más solvente. En el caso del cloroformo, una vez seco el residuo, se agregó también KOH 2 M para disolverlo. A partir de estas soluciones preparadas con el mismo solvente (KOH 2 M), se procedió a realizar la cuantificación de los compuestos fenólicos. A 2 mL de una solución acuosa al 2% de carbonato de sodio se le agregaron 100 μ L de los residuos preparados. 2 min después se agregaron 100 μ L de reactivo de

Folin-Ciocalteu al 50%. Después de 20 min de incubación en la oscuridad, la mezcla de reacción fue colocada en tubos de microcentrifuga ámbar y centrifugada a 14,000 r.p.m. durante 10 min, con el fin de eliminar el precipitado formado. Una vez terminada la centrifugación fue medida la absorbancia del sobrenadante a 750 nm contra un blanco. El blanco contenía todos los reactivos a excepción del residuo preparado, en lugar de éste se colocaron 100 μ L de KOH 2 M utilizado para disolver los residuos. El contenido de fenoles totales fue expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG/g muestra base seca) y fue calculado en base a una curva de calibración de ácido gálico disuelto en KOH 2 M. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7. 5. Evaluación de las Propiedades Nutraceuticas de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles

7. 5. 1. Medición de la Capacidad Antioxidante Mediante la Reducción de Radicales Libres (TEAC-DPPH)

7. 5. 1. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

Para medir la capacidad antioxidante mediante la reducción de radicales libres se utilizó la técnica del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (**Szydłowska-Czerniak y col., 2010; Tabart y col., 2009; Corral-Aguayo y col., 2008; Zielinska y col., 2007** con modificaciones). En el caso de los extractos etanólicos y metanólicos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*, se utilizaron 900 μ L de una solución metanólica de DPPH 0.13 mM a la cual se le agregaron 150 μ L del extracto, posteriormente la mezcla de reacción se incubó durante 20 min en la oscuridad y transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm contra un blanco. El blanco consistía de 900 μ L de metanol absoluto más 150 μ L del agente de extracción en cuestión. La capacidad antioxidante fue expresada en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca (μ mol ET/g muestra base seca) y fue calculada en base a una curva de calibración de Trolox disuelto en el agente de extracción en cuestión. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

En cuanto a los extractos acuosos obtenidos de ambos hongos, el método fue modificado debido a la producción de un precipitado al ocurrir la reacción, tal precipitado alteraba la lectura en el espectrofotómetro de luz UV-visible. La modificación realizada fue una incubación de solo 10 min, posteriormente una centrifugación (Clay Adams, modelo micro 2000) a 14,000 r.p.m. durante 5 min, y una vez terminada la centrifugación, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y de nuevo centrifugado a 14,000 r.p.m. durante 5 min. Después de lo anterior, se procedió a realizar la lectura del sobrenadante en el espectrofotómetro de luz UV-visible a 515 nm contra un blanco, el blanco consistía de 900 μL de metanol absoluto más 150 μL de agua destilada. Lo anterior se realizó en tubos de microcentrífuga color ámbar debido a la necesidad de que la reacción se debía llevar a cabo en la oscuridad. La capacidad antioxidante fue expresada en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/g}$ muestra base seca) y fue calculada en base a una curva de calibración de Trolox disuelto en el agente de extracción en cuestión. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7. 5. 1. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

También fue medida la capacidad antioxidante de la melanina extraída del huitlacoche y de la melanina sintética utilizando el radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Se realizaron algunas modificaciones al método debido a la insolubilidad de la melanina, estas modificaciones se basaron en el trabajo presentado por **Serpen y col. (2007)**. Primero, la melanina fue preparada en suspensión, para estos se pesaron 2 mg de melanina (sintética, extracción 1 y extracción 2) la cual fue molida en mortero, posteriormente en el mismo mortero se agregaron 5 ml de metanol absoluto y el homogenizando fue transferida a viales con una pipeta Pasteur. A partir de las suspensiones de melanina se realizaron las determinaciones. Las determinaciones se realizaron utilizando 900 μL de una solución metanólica de DPPH 0.13 mM a la cual se le agregaron 150 μL de la suspensión metanólica de melanina, luego la mezcla de reacción se colocó a agitación en vortex durante 15 min y transcurrido el tiempo se centrifugó (Clay Adams, modelo micro 2000) a 14,000 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente, se procedió a realizar la lectura del sobrenadante en el espectrofotómetro de luz UV-visible a 515 nm contra un blanco, el blanco consistía únicamente de metanol absoluto. Lo anterior se realizó en tubos de microcentrífuga color ámbar debido a la necesidad de que la reacción se debía llevar a cabo en la oscuridad. La capacidad antioxidante fue expresada en

micromoles equivalentes de Trolox procedentes de melanina por gramo de muestra en base seca y micromoles equivalentes de Trolox por miligramo de melanina ($\mu\text{mol ET}$ procedentes de melanina/g muestra base seca y $\mu\text{mol ET/mg}$ de melanina), lo anterior fue calculado en base a una curva de calibración de Trolox disuelto en metanol absoluto. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

De la misma forma en que se midió la capacidad antioxidante de la melanina, fue medida la capacidad antioxidante en los residuos de la extracción de melanina debido a su insolubilidad. Sin embargo, los residuos fueron preparados para su análisis de manera distinta a la melanina ya que se encontraban disueltos en solventes diferentes. Al igual que para la cuantificación de compuestos fenólicos, fue medido el volumen total del residuo con el fin de tener los datos suficientes para los cálculos posteriores. Luego se tomó una alícuota de volumen conocido con la cual se trabajaría. A cada alícuota se le neutralizó el pH (Denver Instrument modelo UP-25, Hanna Instruments modelo HI 8314) llevándolo a 7 con HCl o KOH según correspondiera, esto se realizó con todos los residuos a excepción del cloroformo, el cual se colocó en una campana extractora para que el solvente se evaporara y el residuo quedara seco. Una vez que los residuos tenían un pH de 7, se procedió a rotoevaporar a sequedad. Ya secos, los residuos fueron resuspendidos en metanol absoluto; éstos fueron resuspendidos a los volúmenes de las alícuotas tomadas o más, si existía la necesidad de aplicar más metanol. En el caso del cloroformo, una vez seco el residuo, se agregó también metanol absoluto para resuspenderlo. A partir de estas suspensiones preparadas con metanol absoluto se procedió a realizar la medición de capacidad antioxidante. Las determinaciones se realizaron en tubos de microcentrífuga color ámbar debido a la necesidad de que la reacción se debía llevar a cabo en la oscuridad. La capacidad antioxidante fue expresada en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/g}$ muestra base seca) y fue calculada en base a una curva de calibración de Trolox disuelto en metanol absoluto. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7. 5. 2. Determinación de la Capacidad Antioxidante *in vitro* por el Método ORAC

7. 5. 2. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

El método empleado fue descrito por **Ou y col. (2001)**. Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos, la cual se utilizó para preparar todos los reactivos y las

diluciones necesarias. La solución amortiguadora de fosfatos se preparó mezclando 71 mL de fosfato de sodio monobásico 0.2 M y 304 mL de fosfato de sodio dibásico 0.2 M, esta solución se llevó a 900 mL con agua destilada y se ajustó el pH a 7.4 con solución de NaOH o HCl diluida cuidando de no rebasar el volumen de 1 L, posteriormente se aforó a 1 L. La solución se almacenó en botella ámbar a 4°C. Se preparó una solución madre de fluoresceína 0.5315 mM (5 mg en 25 mL), tal solución se almacena en refrigeración hasta por 1 mes. De esta solución se prepara la solución de trabajo 8.185×10^{-5} mM (7.7 μ L de la solución madre aforado a 50 mL).

Se tomaron 1.5 mL de la solución de trabajo de fluoresceína y se colocaron en una celda espectrofotométrica. En la misma celda se agregó 0.75 mL del estándar de Trolox (disuelto en la solución amortiguadora de fosfatos), o muestra (diluida en solución amortiguadora con el objetivo de que el poder antioxidante decaiga en el lapso de tiempo menor que el estándar de Trolox 40 μ M y mayor que el de 10 μ M) y se colocó a baño maría (PolyScience) a 37°C por 5 min. Después de este tiempo se agregó 0.75 mL de solución de AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano)-HCl] (0.415 g aforado a 10 mL), y se mantuvo en agitación. Inmediatamente se tomó la primera lectura en el espectrofluorómetro (Perkin Elmer, modelo LS 50B) a una $\lambda_{\text{excitación}}=493$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=515$ nm. Se continuó leyendo la celda cada minuto hasta que el valor de la intensidad correspondió a un 10% del valor inicial. En este procedimiento se corrió un blanco de solución amortiguadora junto con la muestra y un blanco de solvente (el cual se prepara con la misma dilución a la que se encuentra diluida la muestra), el valor del blanco de solvente es restado del valor obtenido por la muestra con el fin de eliminar el efecto del solvente en la reacción. Los valores se reportaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca (μ mol ET/g muestra base seca) mediante una curva estándar usando el área neta bajo la curva (ANBC) de cuatro concentraciones de Trolox (10, 20, 30 y 40 μ M). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para el cálculo del valor ORAC se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{ANBC} = (\text{ABC muestra} - \text{ABC blanco})$$

$$\text{ABC} = \text{área bajo la curva} = 0.5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_i/f_0$$

Donde:

f_0 = la fluorescencia inicial leída al tiempo 0

f_i = la fluorescencia leída al tiempo i

7. 5. 2. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

También fue determinada la capacidad antioxidante de la melanina extraída de huitlacoche así como de la melanina sintética por este método. Sin embargo, el procedimiento sufrió algunas modificaciones debido a la insolubilidad de la melanina. Para las determinaciones se utilizó una suspensión de melanina usando la solución amortiguadora de fosfatos como medio líquido. Las suspensiones fueron preparadas pesando 2 mg de melanina (sintética, extracción 1 y extracción 2) la cual fue molida en mortero, posteriormente en el mismo mortero se agregaron 5 mL de la solución amortiguadora de fosfatos y homogenizando con una pipeta Pasteur fue transferida a viales. Una vez que se prepararon las suspensiones de melanina se realizaron las determinaciones siguiendo el mismo método usado para los demás extractos, con la diferencia de que no se corrió junto con la muestra un blanco de solvente, lo anterior debido a que el medio líquido de la suspensión era la solución amortiguadora de fosfatos, misma con la que se preparan todos los reactivos y por lo tanto no existía un efecto dado por algún solvente. Los valores se reportaron como micromoles equivalentes de Trolox procedentes de melanina por gramo de muestra en base seca y micromoles equivalentes de Trolox por miligramo de melanina ($\mu\text{mol ET}$ procedentes de melanina/g muestra base seca y $\mu\text{mol ET/mg}$ de melanina) mediante una curva estándar usando el área neta bajo la curva (ANBC) de cuatro concentraciones de Trolox (10, 20, 30 y 40 μM). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7. 5. 3. Medición de la Capacidad de los Extractos de Inducir Motilidad Intestinal

7. 5. 3. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

Para medir la capacidad de los extractos de inducir motilidad intestinal se montó una técnica utilizando intestino de rata, la cual se basó en la técnica *In vitro* utilizada por **Borrelli y col. (2006)**. La técnica, a *grosso modo*, consistió en obtener segmentos (2-3 cm) de la porción inicial del intestino delgado de rata (Wistar macho), purgar su contenido y colocarlos en solución Ringer (NaCl 118.5 mM, KCl 4.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, Dextrosa 10 mM, KH₂PO₄ 1.1 mM, MgSO₄ 1.1 mM, CaCl₂ 25 mM). El órgano aislado se montó de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tal forma que se pudieran registrar las contracciones del eje longitudinal en un baño de órganos lleno con solución Ringer aireada y tibia (37°C); el tejido se conectó a un transductor isotónico conectado a un sistema de fisiógrafo (Biopac Systems modelo MP150; software AcqKnowledge 3.8.2). En el principio de cada experimento, se calibró el equipo y la porción de intestino se colocó en el baño de órganos ajustándose a una tensión basal (\approx 2 gramos fuerza). Después de un mínimo de 10 min de periodo de equilibrio y sin un cambio en el comportamiento del tejido (tensión y peristaltismo), éste fue sujeto de estimulación por los diferentes extractos. Para la estimulación se agregaron al baño de tejidos 500 μ L de los extractos a diferentes concentraciones (0.5, 5 y 50 mg/mL). El efecto de cada concentración (de la más pequeña a la más grande) fue seguida por un mínimo de 10 min antes de estimular con la siguiente concentración. Después de que fueron probadas las tres concentraciones de un mismo extracto, el tejido se desmontó y fue montado un nuevo tejido para probar el siguiente extracto. También fue probado un control de acetilcolina a una concentración en el baño de órganos de 1×10^{-6} M. Los valores de tensión media de la contracción fueron reportados en gramos fuerza (gf) y se realizaron cuatro series experimentales para cada extracto (etanólico, metanólico, acuoso frío y acuoso caliente) obtenido de ambos hongos y el control. En el caso de los extractos etanólicos y metanólicos de ambos hongos, fue necesario evaporar el solvente y redissolver el extracto en agua destilada, ya que de otra manera el solvente tenía un efecto que enmascaraba el efecto del extracto.

7. 5. 3. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

Para probar el efecto de la melanina se siguió la misma metodología usada para los demás extractos; sin embargo ésta se utilizó en suspensión, teniendo como medio líquido agua destilada. Las concentraciones utilizadas fueron de 0.4, 0.04 y 0.004 mg/mL.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de las Muestras de Huitlacoche (*Ustilago maydis*) y Setas (*Pleurotus ostreatus*) Comestibles

Fueron obtenidas las muestras tanto de huitlacoche como de setas comestibles. Las muestras de huitlacoche fueron de origen comercial y las de setas comestibles mediante cultivo en residuos lignocelulósicos (rastroy de maíz).



Figura 1. En la fotografía se puede observar las muestras de huitlacoche de origen comercial.



Figura 2. En la ilustración se muestra el proceso con el que se obtuvieron los cuerpos fructíferos del hongo *P. ostreatus*, lo anterior se logró mediante un protocolo de cultivo en residuos lignocelulósicos. 1) Cultivo de *P. ostreatus* en PDA (papa-dextrosa-agar); a partir de estos cultivos se inoculó el trigo esterilizado. 2) Trigo inoculado con el cultivo de *P. ostreatus*; después del periodo de incubación el trigo se encontraba totalmente invadido por el micelio del hongo. 3)

Mezcla del rastrojo de maíz pasteurizado con el trigo invadido por el micelio de *P. ostreatus*. 4) Paquetes con la mezcla de rastrojo y trigo invadido por el micelio del hongo; los residuos linocelulócicos (rastrojo) sirvieron como un segundo sustrato para el desarrollo y fructificación del hongo. 5) Crecimiento del micelio del hongo en los paquetes de mezcla de rastrojo y trigo invadido; las condiciones de incubación fueron de oscuridad parcial, temperatura templada y una buena ventilación. 7) Primordios que después dieron origen a los cuerpos fructíferos del hongo; para inducir la fructificación se mantuvieron las mismas condiciones de incubación añadiendo una alta humedad. 8) Cuerpos fructíferos maduros; en estas condiciones se cosecharon los cuerpos fructíferos utilizados para los análisis posteriores.



Figura 3. En la fotografía se muestran los cuerpos fructíferos ya cosechados, posteriormente fueron almacenados en refrigeración y transportados al laboratorio para el procesamiento de la muestra.

8. 2. Preparación de las Muestras para Análisis Posteriores

Las muestras de ambos hongos fueron llevadas al laboratorio y limpiadas de materiales extraños, posteriormente almacenadas bajo congelación (-70°C) para ser liofilizadas. La liofilización se llevó a cabo en dos liofilizadoras, una de ellas se localiza en el Laboratorio de Instrumentación en el edificio 202 de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Labconco modelo Freezone 4.5) y la otra se encuentra en el Laboratorio de Microbiología en el edificio 20 de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Virtis modelo 620L 3150 0C).

Las muestras ya secas fueron trituradas hasta obtener un polvo uniforme. Los polvos liofilizados de cada hongo fueron mezclados para obtener un pool de muestra de cada hongo. En total se obtuvieron 120 g de polvo liofilizado por pool de muestra, los cuales

fueron almacenados herméticamente y bajo congelación (-20°C) hasta los análisis posteriores.



Figura 4. En la ilustración se muestran las dos liofilizadoras utilizadas para la deshidratación de las muestras. Del lado izquierdo se muestra la liofilizadora Labconco modelo Freezezone 4.5, localizada en el Laboratorio de Instrumentación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Del lado derecho se muestra la liofilizadora Virtis modelo 620L 3150 0C localizada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.



Figura 5. En la ilustración se pueden observar las muestras de ambos hongos liofilizados y triturados en el molino de café y especias. Del lado izquierdo huitlacoche y del lado derecho *P. ostreatus*.

Se determinó el porcentaje de humedad de los pool de muestra de ambos hongos, los datos se muestran a continuación:

Tabla 5. Porcentaje de Humedad en Huitlacoche Liofilizado				
Repetición	Peso de la muestra (gramos)	Muestra seca a peso constante (gramos)	Cantidad de humedad (gramos)	Porcentaje de humedad (%)
1	1.0085	0.9134	0.0951	9.4
2	1.0009	0.9073	0.0936	9.4
3	1.0003	0.9094	0.0909	9.1
Promedio				9.3

Tabla 6. Porcentaje de Humedad en <i>P. ostreatus</i> Liofilizado				
Repetición	Peso de la muestra (gramos)	Muestra seca a peso constante (gramos)	Cantidad de humedad (gramos)	Porcentaje de humedad (%)
1	1.0011	0.9051	0.096	9.6
2	1.0014	0.908	0.0934	9.3
3	1.0008	0.9053	0.0955	9.5
Promedio				9.5

El porcentaje de humedad del pool de muestra de huitlacoche y *P. ostreatus* liofilizado fue del 9.3% y 9.5% respectivamente. Con los datos anteriores se harán los cálculos necesarios para la expresión de los resultados en base seca.

8. 3. Obtención de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles.

8. 3. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

Se obtuvieron los extractos con los 4 diferentes agentes de extracción: etanol al 95%, metanol al 95%, agua fría y agua caliente. Cada uno de los extractos se liofilizó y se llevó a una concentración de 50 mg/mL. En las ilustraciones siguientes (Figuras 6, 7 y 8) se esquematiza el proceso por el que se obtuvo cada uno de los extractos.

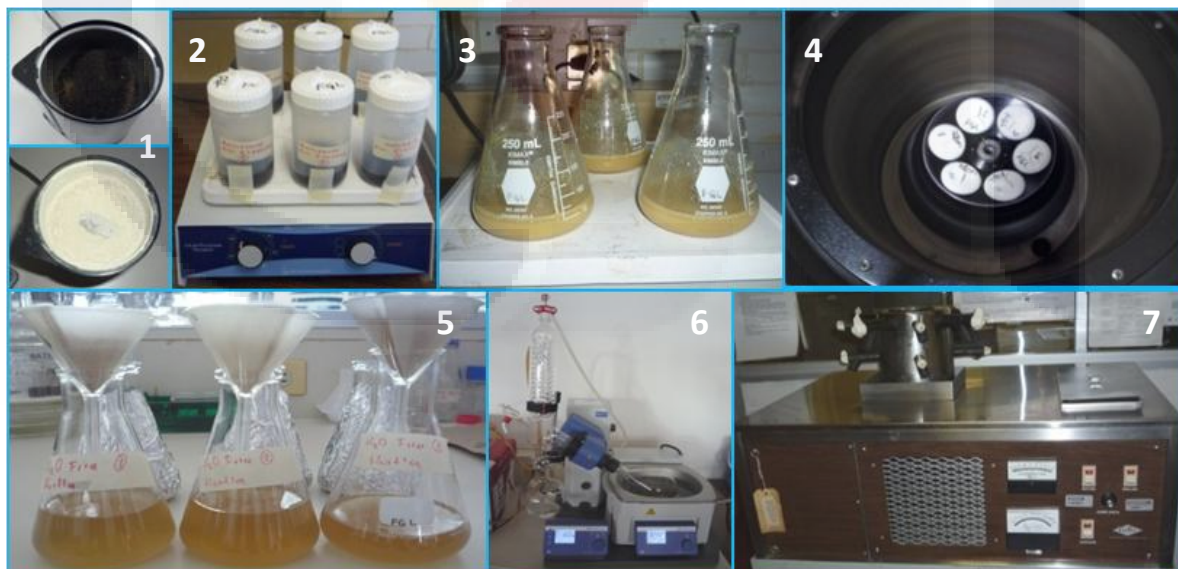


Figura 6. En la ilustración se resume el proceso de extracción por el que se obtuvieron los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos fríos de ambos hongos. 1) Polvo de huitlacoche (arriba) y *P. ostreatus* (abajo) liofilizados; a partir de este material se prepararon los diferentes extractos. 2 y 3) Extracción; se realizó mediante la agitación de la mezcla preparada con la muestra y el agente de extracción durante 24 h continuas, #2 huitlacoche y #3 *P. ostreatus*. 4)

Separación de la muestra y extracto mediante centrifugación. 5) Filtración del extracto; este proceso se realizó con el fin de eliminar los restos de muestra que pudiera contener el extracto. 6) Rotovaporación de los extractos; este proceso se realizó únicamente en los extractos etanólicos y metanólicos para eliminar el alcohol, en el extracto acuoso frío se liofilizo directamente. 7) Liofilización de los extractos; en el caso de los extractos etanólicos y metanólicos después de ser rotovaporados estos fueron resuspendidos en agua y posteriormente liofilizados. Es necesario mencionar que cada muestra se extrajo en 3 ocasiones y se unieron los 3 extractos para el proceso de rotovaporación y liofilización.



Figura 7. En la ilustración se resume el proceso de extracción por el que se obtuvieron los extractos acuosos calientes de ambos hongos. 1) Polvo de huitlacoche (arriba) y *P. ostreatus* (abajo) liofilizados; a partir de este material se prepararon los diferentes extractos. 2 y 3) Extracción; se realizó mediante la agitación de la muestra en agua en ebullición durante 10 min, #2 huitlacoche y #3 *P. ostreatus*. 4) Separación de la muestra y extracto mediante centrifugación. 5) Filtración del extracto; este proceso se realizó con el fin de eliminar los restos de muestra que pudiera contener el extracto. 6) Liofilización de los extractos. Es necesario mencionar que cada muestra se extrajo en 3 ocasiones y se unieron los 3 extractos para el proceso de liofilización.



Figura 8. En la fotografía se muestran algunos de los extractos obtenidos. Después de haber sido liofilizados los extractos fueron redissueltos a una concentración de 50 mg/mL con su correspondiente agente de extracción. Posteriormente se almacenaron en envases color ámbar para protegerlos de la luz y en congelación. A partir de estos extractos se realizaron los análisis correspondientes.

En la tabla y gráfica siguientes se muestra el rendimiento de cada una de las extracciones en ambos hongos. Los resultados se muestran en gramos de extracto por 10 gramo de muestra base seca (gr de extracto/gr de muestra base seca) y porcentaje de extracción:

Hongo	Extracto	Rendimiento (gr de extracto/ 10 gr muestra base seca)	Extracción %
Huitlacoche	Etanólico	1.345 ± 0.047	13.45 f
	Metanólico	1.754 ± 0.131	17.54 e
	Acuoso Frío	2.946 ± 0.069	29.46 c
	Acuoso Caliente	2.953 ± 0.130	29.53 c
<i>P. ostreatus</i>	Etanólico	1.174 ± 0.091	11.74 f
	Metanólico	2.05 ± 0.038	20.5 d
	Acuoso Frío	5.618 ± 0.100	56.18 a
	Acuoso Caliente	3.637 ± 0.316	36.37 b

Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, α=0.05). Coeficiente de variabilidad, 5.30%.

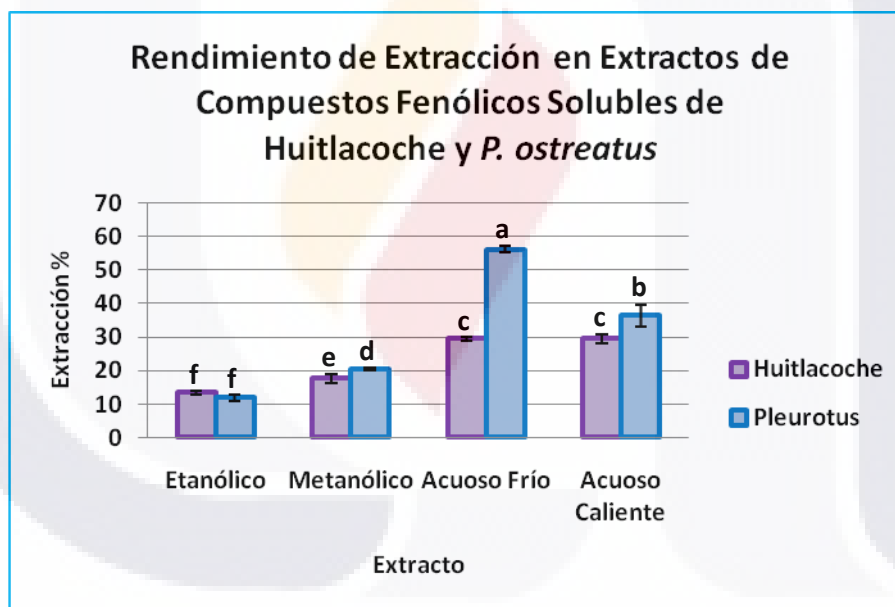


Figura 9. En la gráfica se muestran los rendimientos de extracción en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *P. ostreatus*. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, α=0.05). Coeficiente de variabilidad, 5.30%.

8. 3. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

Siguiendo la metodología propuesta por Harki y col. (1997) se logró extraer lo que ellos reportan como melanina; lo anterior mediante un proceso de digestión alcalina (bajo

atmósfera de nitrógeno) y purificación de la misma mediante hidrólisis ácida y lavados con cloroformo. Esto solo se realizó en huitlacoche, en el cual es evidente la presencia de melanina. La extracción se llevó a cabo por duplicado.

Las características fisicoquímicas de los productos obtenidos concuerdan con las características de la melanina, como son la insolubilidad, el color negro-marrón y la resistencia a los tratamientos químicos agresivos como ácidos y álcalis concentrados.

En las ilustraciones siguientes (Figuras 10, 11, 12 y 13) se esquematiza el proceso por el que se obtuvo la melanina.

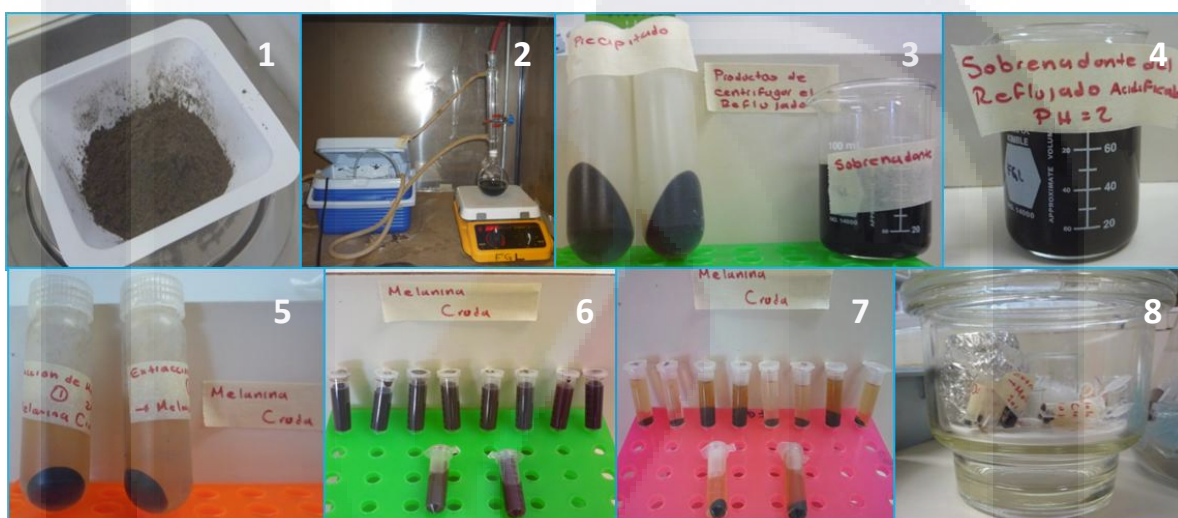


Figura 10. En la ilustración se muestra el proceso de digestión alcalina. 1) Polvo de huitlacoche liofilizado; a partir de este material se comenzó la extracción. 2) Reflujo de la muestra con KOH; este procedimiento se llevó a cabo durante 5 h bajo atmósfera de nitrógeno. 3) Separación del producto del reflujo mediante centrifugación, del lado izquierdo se encuentra el precipitado (sobrante de la muestra) y del lado derecho el sobrenadante; el sobrenadante es la fracción con la que se siguió trabajando. 4) Acidificación del sobrenadante a pH 2; este paso se realizó para precipitar la “melanina cruda” la cual fue separada mediante centrifugación. En esta parte del proceso se obtuvo el primer residuo de la extracción de melanina, que fue el sobrenadante de la precipitación de la “melanina cruda”. 5) Lavado de la “melanina cruda” con agua destilada; el agua obtenida de los lavados fue colectada y de esta forma se obtuvo el segundo residuo de la extracción de la melanina cruda. 6 y 7) Transferencia de la “melanina cruda” a tubos de microcentrífuga; se preparó una suspensión de la “melanina cruda” con agua destilada y fue transferida a tubos de microcentrífuga (6), posteriormente se centrifugó para obtener el pellet de “melanina cruda” (7). El agua del sobrenadante se juntó con el agua de los lavados. 8) Secado de los pellets de “melanina cruda” en desecador; este proceso se realizó bajo atmósfera de nitrógeno. Es necesario mencionar que al sobrante de la muestra obtenido del reflujo se le aplicó todo el procedimiento en otras dos ocasiones, obteniéndose más “melanina cruda”. Toda la melanina obtenida se juntó en un solo pool de “melanina cruda” a partir del cual se continuaron los siguientes procesos. Lo mismo se realizó con los residuos de la extracción de melanina.

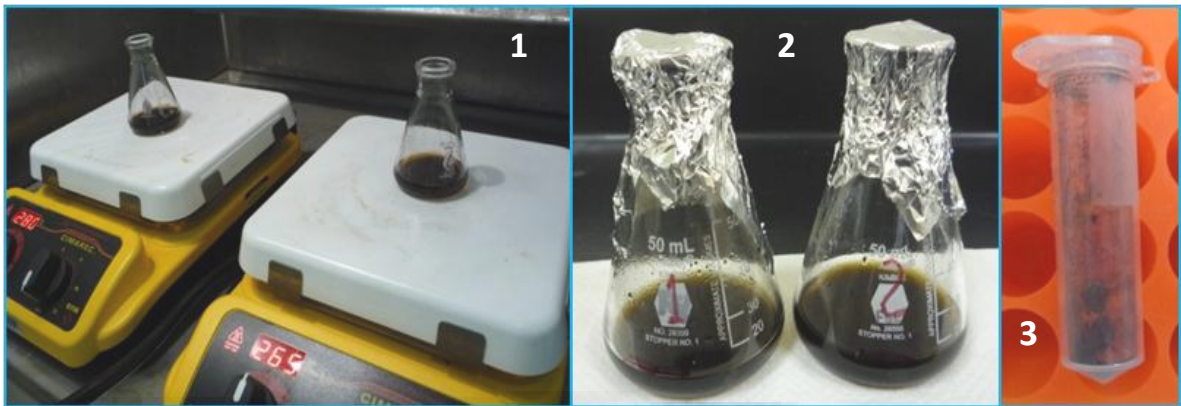


Figura 11. En la ilustración se resume el proceso de hidrólisis ácida de la “melanina cruda”. Éste fue realizado con la finalidad de eliminar algunas moléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas asociadas con la “melanina cruda”. 1) Hidrólisis de la “melanina cruda”; este proceso se realizó con HCl 7 M en ebullición durante 2 h. 2) “Melanina no hidrolizable”; una vez terminado el proceso de hidrólisis la melanina que resiste es llamada “melanina no hidrolizable”, esta fue separada del ácido por centrifugación y lavada con HCl 0.01 M y agua destilada. Tanto el HCl 7 M de la hidrólisis como el HCl 0.01 M y agua destilada de los lavados fueron considerados como el tercero, cuarto y quinto residuo de la extracción de melanina. 3) “Melanina no hidrolizable” seca; el secado de la “melanina no hidrolizable” se llevó a cabo en desecador bajo atmósfera de nitrógeno.



Figura 12. En la ilustración se resume el proceso de lavado con cloroformo de la “melanina no hidrolizable”. 1) Solución alcalina de “melanina no hidrolizable”. 2) Mezcla de cloroformo y solución alcalina de “melanina no hidrolizable”, se puede observar la separación de ambos elementos en 2 fases. 3) Agitación de la mezcla; este proceso se realizó bajo atmósfera de nitrógeno. 4) Centrifugación de la mezcla. 5) Separación de la fase de cloroformo; después de separar la fase de cloroformo el proceso fue repetido en 2 ocasiones más a la solución alcalina de melanina. El cloroformo separado de los 3 lavados se considero como el sexto residuo de la extracción de melanina. 6) Precipitación de la melanina por acidificación a pH 2; se realizó con HCl y la melanina fue separada por centrifugación. El sobrenadante (HCl) fue considerado como el séptimo residuo de la extracción de melanina. 7) Lavado de la melanina con agua destilada. El agua de los lavados

fue considerado como el octavo residuo de la extracción de melanina. 8) Secado de la “melanina pura” en desecador; este proceso se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno.

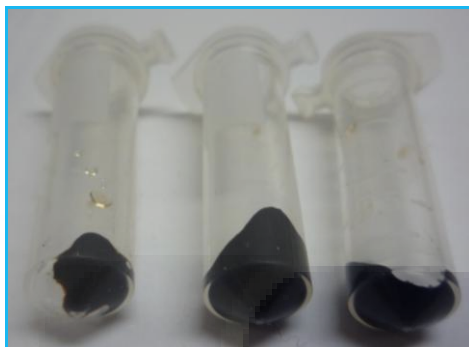


Figura 13. En la fotografía se muestra la melanina pura después de haber sido lavada con agua destilada.

El balance de la extracción de melanina se muestra a continuación:

Tabla 8. Balance de la Extracción de Melanina		
Extracción	1	2
Peso de la muestra (g)	5.0018	5.0007
Peso seco de la muestra (g)	4.5366	4.5356
Melanina cruda (mg)	311.1	328.9
Melanina no hidrolizable (mg)	90.2	87.1
Melanina Pura (mg)	55.4	47.8
Melanina extraída por g de muestra en base seca (mg/g)	12.211	10.538
Rendimiento de extracción (%)	1.22	1.05

8. 4. Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales

8. 4. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

Se determinó cuantitativamente el contenido de compuestos fenólicos en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (extracto etanólico, metanólico, acuoso frío y caliente). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico extraídos por gramo de muestra en base seca (mg EAG/ g muestra base seca). Estos se muestran a continuación:

Hongo	Extracto	mg EAG/g muestra base seca
Huitlacoche	Etanólico	3.8 ± 0.1 d
	Metanólico	4.2 ± 0.11 d
	Acuoso Frío	6.8 ± 0.20 b
	Acuoso Caliente	4.2 ± 0.36 d
<i>P. ostreatus</i>	Etanólico	2.3 ± 0.1 f
	Metanólico	2.6 ± 0.23 ef
	Acuoso Frío	7.9 ± 0.37 a
	Acuoso Caliente	4.4 ± 0.2 cd

Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, α=0.05). Coeficiente de variabilidad, 5.19%.

A continuación se muestran los resultados representados en gráfica de barras:

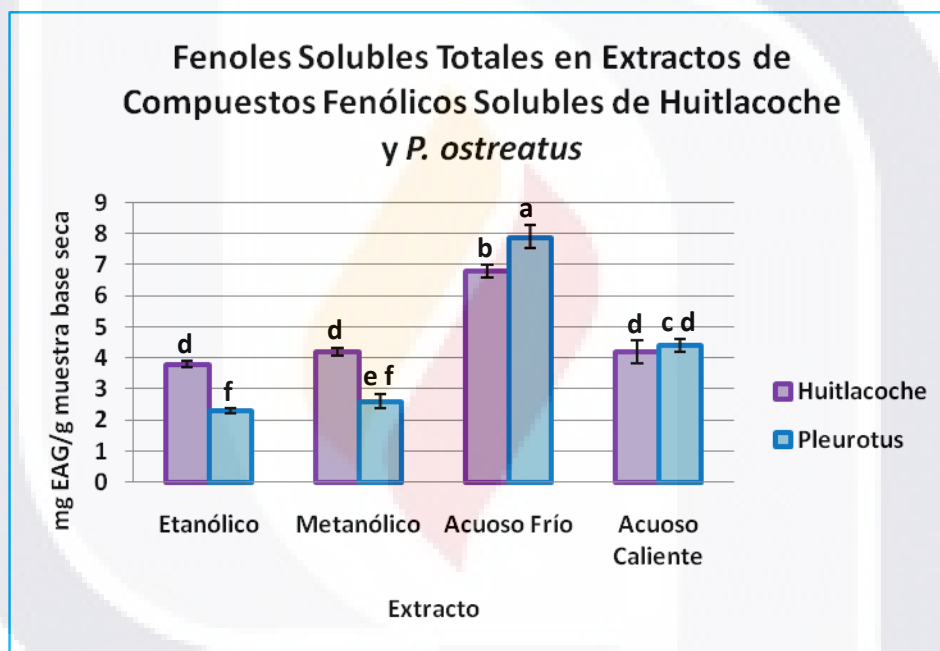


Figura 14. En la gráfica se muestran los resultados de fenoles solubles totales en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *P. ostreatus*. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, α=0.05). Coeficiente de variabilidad, 5.19%.

8. 4. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

Se determinó cuantitativamente el contenido de compuestos fenólicos en los extractos de compuestos fenólicos insolubles de huitlacoche (melanina y residuos de la extracción de melanina). Para la determinación fue necesario prepara soluciones alcalinas (KOH 2 M) tanto de la melanina como de los residuos. En el caso de la melanina, no fue posible

disolver toda la cantidad de muestra destinada para preparar la solución, por lo tanto la melanina que no se disolvió fue lavada y secada en desecador. Una vez seca ésta fue pesada y por diferencia se obtuvo la concentración de las soluciones alcalinas de melanina. El balance se muestra a continuación:

Tabla 10. Balance de la Preparación de las Soluciones Alcalinas de Melanina

Procedencia de la melanina	Sintética	Extracción 1	Extracción 2
Peso de la muestra (g)	*	5.0018	5.0007
Peso seco de la muestra (g)	*	4.5366	4.5356
Cantidad de melanina extraída (mg)	*	55.4	47.8
Melanina extraída por g de muestra en base seca (mg/g)	*	12.211	10.538
Cantidad de melanina extraída usada para preparar la solución (mg)	2	2	2
Melanina disuelta (mg)	2	1.5	1.9
Melanina soluble por miligramo de melanina extraída (mg/mg)	1	0.75	0.95
Melanina soluble por g de muestra base seca (mg/g)	*	9.158	10.011

* El dato no existe ya que se trata de un estándar.

Debido a los problemas con la solubilidad de la melanina, los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por miligramo de melanina soluble, miligramos equivalentes de ácido gálico por miligramo de melanina extraída y miligramos equivalentes de ácido gálico procedentes de melanina por gramo de muestra en base seca (mg EAG/mg de melanina soluble, mg EAG/mg de melanina extraída y mg EAG procedentes de melanina/g muestra base seca). Estos se muestran a continuación:

Tabla 11. Fenoles Totales en Melanina			
Muestra	mg EAG/mg de melanina soluble	mg EAG/mg de melanina extraída	mg EAG procedentes de melanina/g muestra base seca
Melanina sintética	0.9 ± 0.039 a	*	*
Melanina extracción 1	1.0 ± 0.010 a	0.74 ± 0.007 b	9.1 ± 0.096 a
Melanina extracción 2	1.0 ± 0.077 a	0.92 ± 0.073 a	9.7 ± 0.778 a
	Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes.		
	Prueba Tukey, α=0.05. Coeficiente de variabilidad, 5.31%.	Prueba T-pareada, α=0.05. Valor P=0.044. *El dato no existe ya que se trata de un estándar.	Prueba T-pareada, α=0.05. Valor P=0.260. *El dato no existe ya que se trata de un estándar.

A continuación se muestran los resultados representados en gráfica de barras:

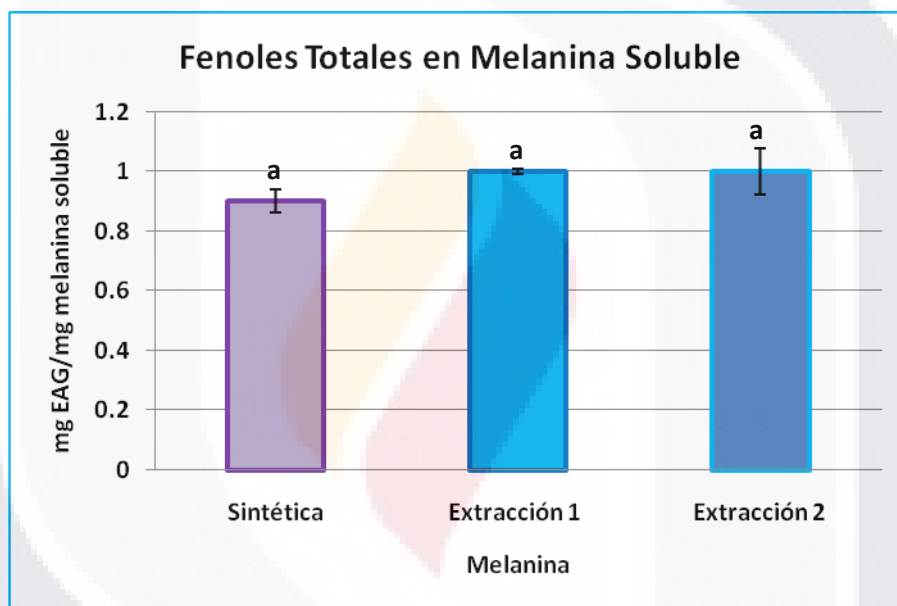


Figura 15. En la gráfica se muestran los resultados de fenoles totales en melanina soluble. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, α=0.05). Coeficiente de variabilidad, 5.31%.

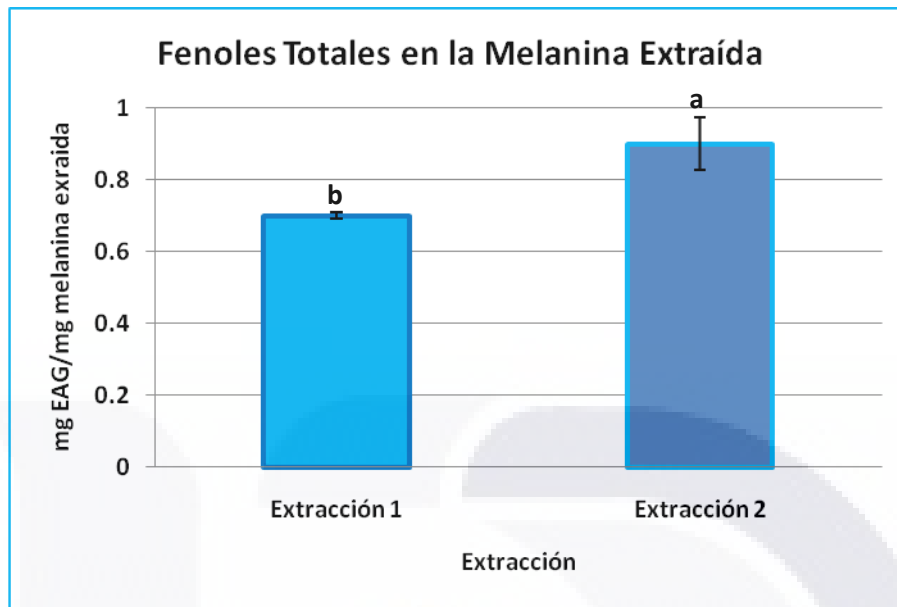


Figura 16. En la gráfica se muestran los resultados de fenoles totales en la melanina extraída. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba T-pareada, $\alpha=0.05$). Valor P=0.044.

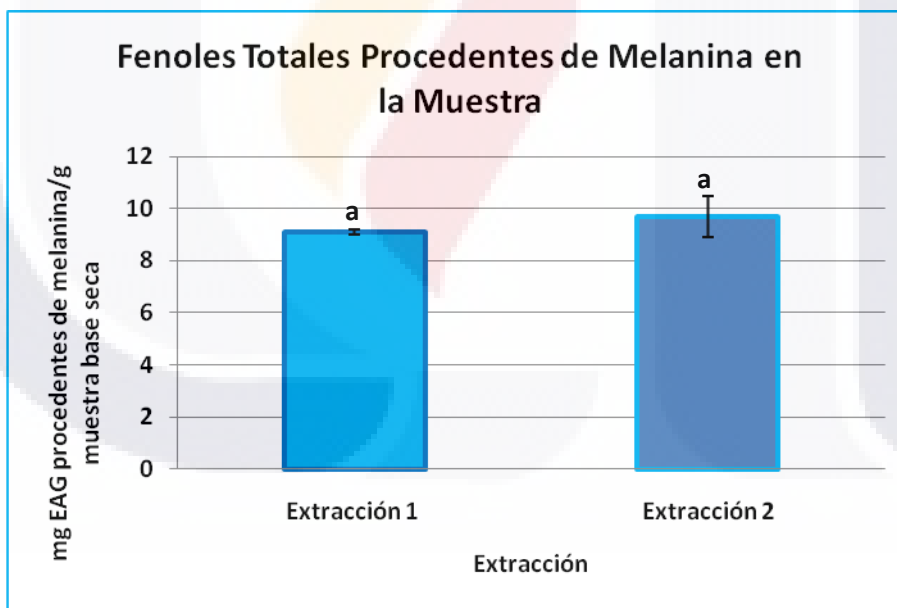


Figura 17. En la gráfica se muestran los resultados de fenoles totales procedentes de melanina en la muestra. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba T-pareada, $\alpha=0.05$). Valor P=0.260.

Los resultados de compuestos fenólicos totales en los residuos de la extracción de melanina se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de

muestra en base seca (mg EAG/g muestra base seca). Estos se muestran en la tabla y gráfica siguientes:

Tabla 12. Fenoles Totales en Residuos de la Extracción de Melanina			
Extracción	Etapa de la extracción	Residuo	mg EAG/g muestra base seca
Extracción 1	Digestión alcalina	Sobrenadante obtenido de la precipitación de la "melanina cruda"	29.7 ± 1.37 a
		Agua de los lavados de la "melanina cruda"	17.3 ± 0.94 b
	Hidrólisis ácida	HCl 7 M utilizado en la hidrólisis ácida de la "melanina cruda"	1.0 ± 0.0 h g
		HCl 0.01 M utilizado en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.3 ± 0.0 h
		Agua utilizada en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.5 ± 0.05 h
	Lavados con cloroformo	Cloroformo obtenido de los lavados	0.1 ± 0.0 h
		Sobrenadante (HCl 7 M) obtenido al precipitar la melanina de la solución alcalina de melanina	0.3 ± 0.0 h
		Agua de los lavados de la melanina	4.4 ± 0.1 d
	Extracción 2	Digestión alcalina	Sobrenadante obtenido de la precipitación de la "melanina cruda"
Agua de los lavados de la "melanina cruda"			14.7 ± 0.20 c
Hidrólisis ácida		HCl 7 M utilizado en la hidrólisis ácida de la "melanina cruda"	1.7 ± 0.05 f g
		HCl 0.01 M utilizado en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.3 ± 0.05 h
		Agua utilizada en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.4 ± 0.0 h
Lavados con cloroformo		Cloroformo obtenido de los lavados	0.1 ± 0.0 h
		Sobrenadante (HCl 7 M) obtenido al precipitar la melanina de la solución alcalina de melanina	0.2 ± 0.0 h
		Agua de los lavados de la melanina	2.9 ± 0.1 e

Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, α=0.05). Coeficiente de variabilidad, 7.00%.

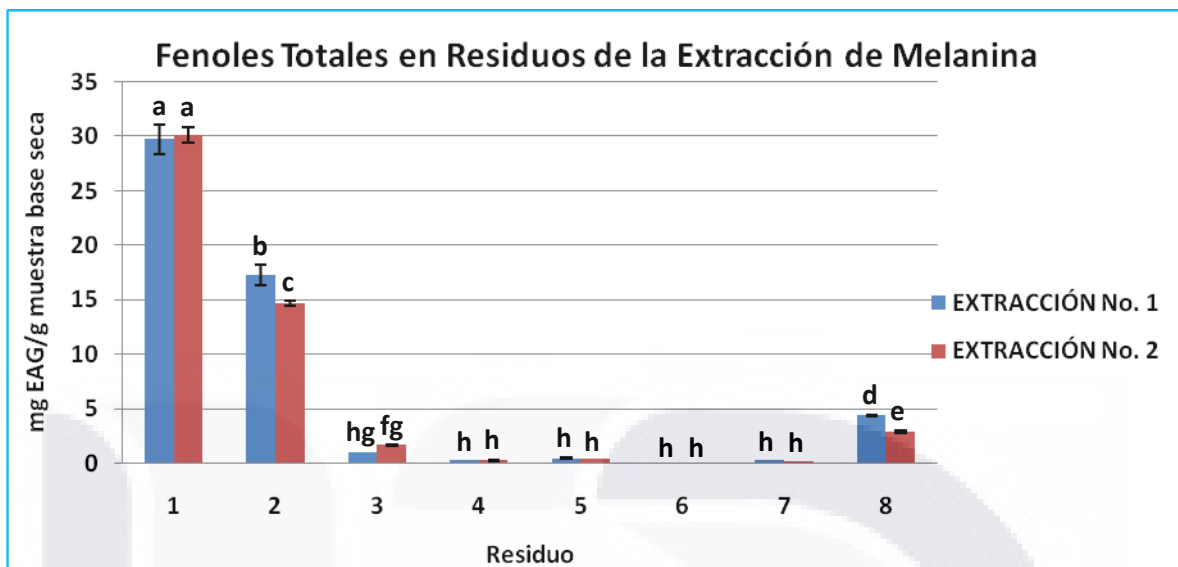


Figura 18. En la gráfica se muestran los resultados de fenoles totales en los residuos de la extracción de melanina. 1) Sobrenadante obtenido de la precipitación de la “melanina cruda”; 2) agua de los lavados de la “melanina cruda”; 3) HCl 7 M utilizado en la hidrólisis ácida de la “melanina cruda”; 4) HCl 0.01 M utilizado en los lavados de la “melanina no hidrolizable”; 5) agua utilizada en los lavados de la “melanina no hidrolizable”; 6) cloroformo obtenido de los lavados; 7) sobrenadante (HCl 7 M) obtenido al precipitar la melanina de la solución alcalina de melanina; 8) agua de los lavados de la melanina. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 7.00%.

8. 5. Evaluación de las Propiedades Nutraceuticas de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles

8. 5. 1. Medición de la Capacidad Antioxidante Mediante la Reducción de Radicales Libres (TEAC-DPPH)

8. 5. 1. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

Se determinó la capacidad antioxidante en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (extracto etanólico, metanólico, acuoso frío y caliente), lo anterior mediante la reducción de radicales libres por el método del DPPH. Los resultados fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox extraídos por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/g}$ muestra base seca). Estos se muestran a continuación:

Hongo	Extracto	$\mu\text{mol ET/g muestra base seca}$
Huitlacoche	Etanólico	0.5 ± 0.05 f g
	Metanólico	3.3 ± 0.25 c
	Acuoso Frío	7.1 ± 0.40 a
	Acuoso Caliente	3.9 ± 0.05 b
<i>P. ostreatus</i>	Etanólico	0.4 ± 0.05 g
	Metanólico	1.0 ± 0.0 e
	Acuoso Frío	2.1 ± 0.1 d
	Acuoso Caliente	0.9 ± 0.1 e

Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 7.48%.

A continuación se muestran los resultados representados en gráfica de barras:

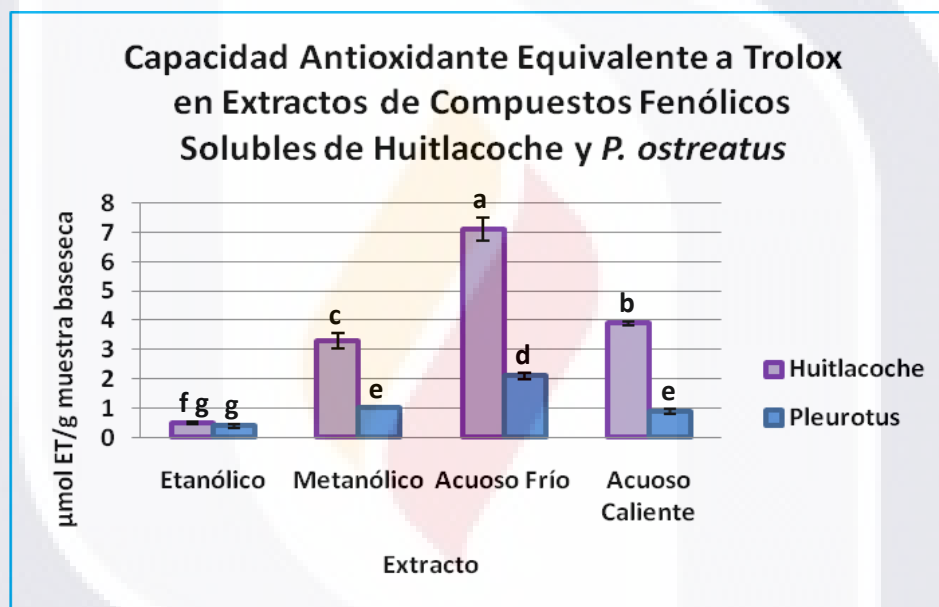


Figura 19. En la gráfica se muestran los resultados de capacidad antioxidante en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *P. ostreatus*. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 7.48%.

8. 5. 1. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

Se determinó la capacidad antioxidante en los extractos de compuestos fenólicos insolubles de huitlacoche (melanina y residuos de la extracción de melanina) mediante el método del DPPH. Debido a la insolubilidad de los extractos se prepararon suspensiones metanólicas tanto de la melanina como de los residuos a partir de las cuales se realizaron las determinaciones.

Los resultados en melanina se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por miligramo de melanina y micromoles equivalentes de Trolox procedentes de melanina por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/mg}$ de melanina y $\mu\text{mol ET}$ procedentes de melanina/g muestra base seca). Estos se muestran en la tabla y gráficas siguientes:

Tabla 14. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox en Melanina		
Muestra	$\mu\text{mol ET/mg}$ de melanina	$\mu\text{mol ET}$ procedentes de melanina/g muestra base seca
Melanina sintética	1.6 ± 0.05 a	*
Melanina extracción 1	0.6 ± 0.15 c	7.3 ± 1.85 a
Melanina extracción 2	0.8 ± 0.05 b	8.8 ± 0.96 a
Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes.		
Prueba Tukey, $\alpha=0.05$. Coeficiente de variabilidad, 10.11%.		Prueba T-pareada, $\alpha=0.05$. Valor $P=0.172$. *El dato no existe ya que se trata de un estándar.

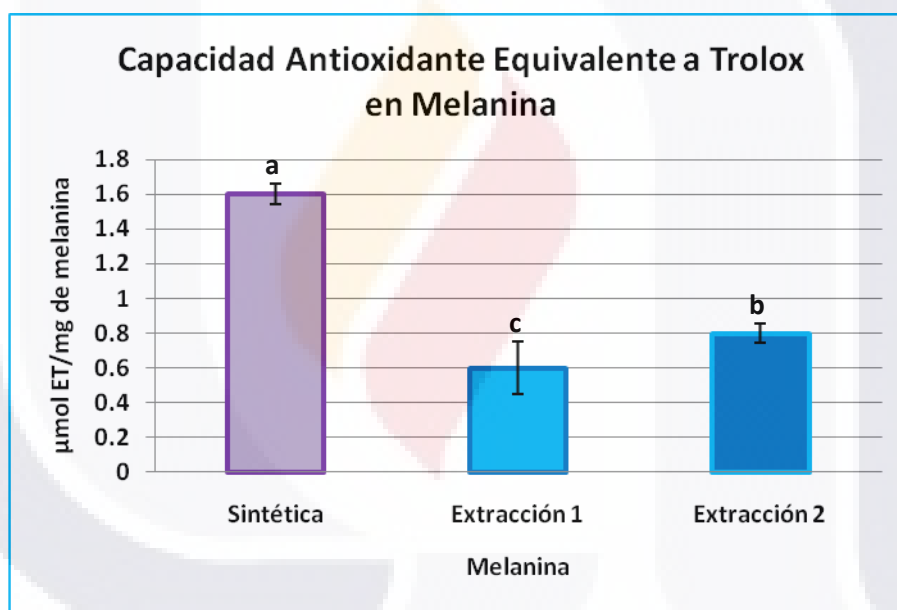


Figura 20. En la gráfica se muestran los resultados de capacidad antioxidante en melanina. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 10.11%.

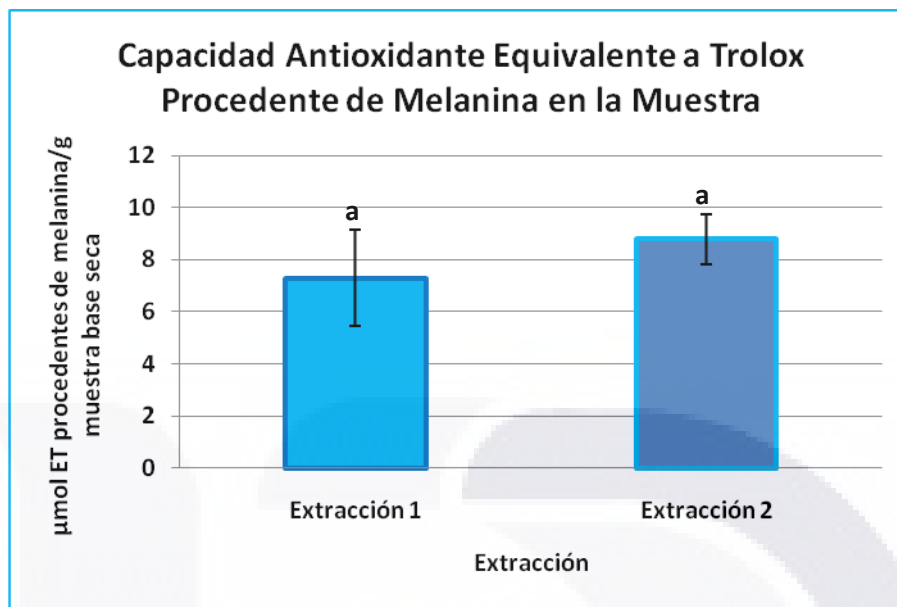


Figura 21. En la gráfica se muestran los resultados de capacidad antioxidante procedente de melanina en la muestra. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba T-pareada, $\alpha=0.05$). Valor $P=0.172$.

En cuanto a los residuos de la extracción de melanina, los resultados de capacidad antioxidante fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/g}$ muestra base seca). Estos se muestran a continuación:

Tabla 15. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox en Residuos de la Extracción de Melanina

Extracción	Etapa de la extracción	Residuo	µmol ET/g muestra base seca
Extracción 1	Digestión alcalina	Sobrenadante obtenido de la precipitación de la "melanina cruda"	15.7 ± 0.88 a
		Agua de los lavados de la "melanina cruda"	8.9 ± 0.1 b
	Hidrólisis ácida	HCl 7 M utilizado en la hidrólisis ácida de la "melanina cruda"	0.5 ± 0.15 f
		HCl 0.01 M utilizado en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.2 ± 0.0 f
		Agua utilizada en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.2 ± 0.05 f
	Lavados con cloroformo	Cloroformo obtenido de los lavados	0.008 ± 0.001 f
		Sobrenadante (HCl 7 M) obtenido al precipitar la melanina de la solución alcalina de melanina	0.2 ± 0.0 f
		Agua de los lavados de la melanina	4.4 ± 0.1 c
Extracción 2	Digestión alcalina	Sobrenadante obtenido de la precipitación de la "melanina cruda"	16.0 ± 0.40 a
		Agua de los lavados de la "melanina cruda"	8.5 ± 1.55 b
	Hidrólisis ácida	HCl 7 M utilizado en la hidrólisis ácida de la "melanina cruda"	1.1 ± 0.20 e f
		HCl 0.01 M utilizado en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.3 ± 0.05 f
		Agua utilizada en los lavados de la "melanina no hidrolizable"	0.2 ± 0.05 f
	Lavados con cloroformo	Cloroformo obtenido de los lavados	0.01 ± 0.0 f
		Sobrenadante (HCl 7 M) obtenido al precipitar la melanina de la solución alcalina de melanina	0.2 ± 0.05 f
		Agua de los lavados de la melanina	1.6 ± 0.23 d e

Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, α=0.05). Coeficiente de variabilidad, 12.96%.

A continuación se muestran los resultados representados en gráfica de barras:

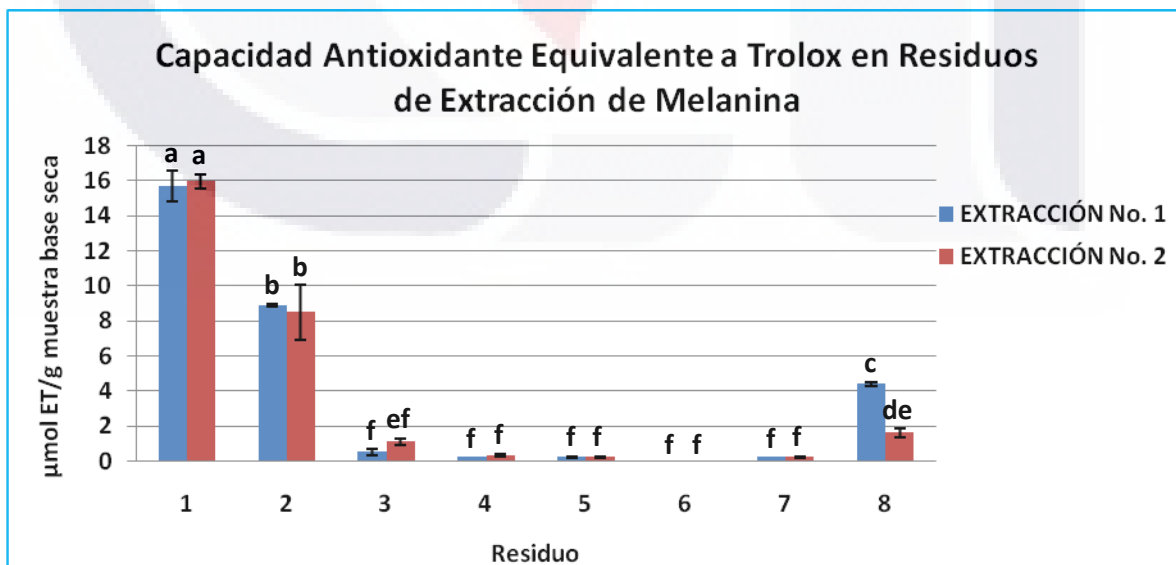


Figura 22. En la gráfica se muestran los resultados de capacidad antioxidante en los residuos de la extracción de melanina. 1) Sobrenadante obtenido de la precipitación de la "melanina cruda"; 2) agua de los lavados de la "melanina cruda"; 3) HCl 7 M utilizado en la hidrólisis ácida de la

“melanina cruda”; 4) HCl 0.01 M utilizado en los lavados de la “melanina no hidrolizable”; 5) agua utilizada en los lavados de la “melanina no hidrolizable”; 6) cloroformo obtenido de los lavados; 7) sobrenadante (HCl 7 M) obtenido al precipitar la melanina de la solución alcalina de melanina; 8) agua de los lavados de la melanina. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 12.96%.

8. 5. 2. Determinación de la Capacidad Antioxidante *in vitro* por el Método ORAC

8. 5. 2. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

Se determinó la capacidad antioxidante mediante método ORAC (oxygen radical absorbance capacity) en los extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (extracto etanólico, metanólico, acuoso frío y caliente). Los resultados fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox extraídos por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/g}$ muestra base seca) y se muestran en la tabla y gráfica siguientes:

Tabla 16. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox por Método ORAC en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>P. ostreatus</i>		
Hongo	Extracto	$\mu\text{mol ET/g}$ muestra base seca
Huitlacoche	Etanólico	136.1 \pm 21.00 a
	Metanólico	75 \pm 6.71 d e
	Acuoso Frío	82.7 \pm 6.57 c d
	Acuoso Caliente	46.6 \pm 3.11 e f
<i>P. ostreatus</i>	Etanólico	56.1 \pm 15.48 d e f
	Metanólico	38.4 \pm 3.67 f
	Acuoso Frío	109.4 \pm 1.48 b
	Acuoso Caliente	41.1 \pm 1.13 f

Se muestran los promedios de dos repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 13.62%.

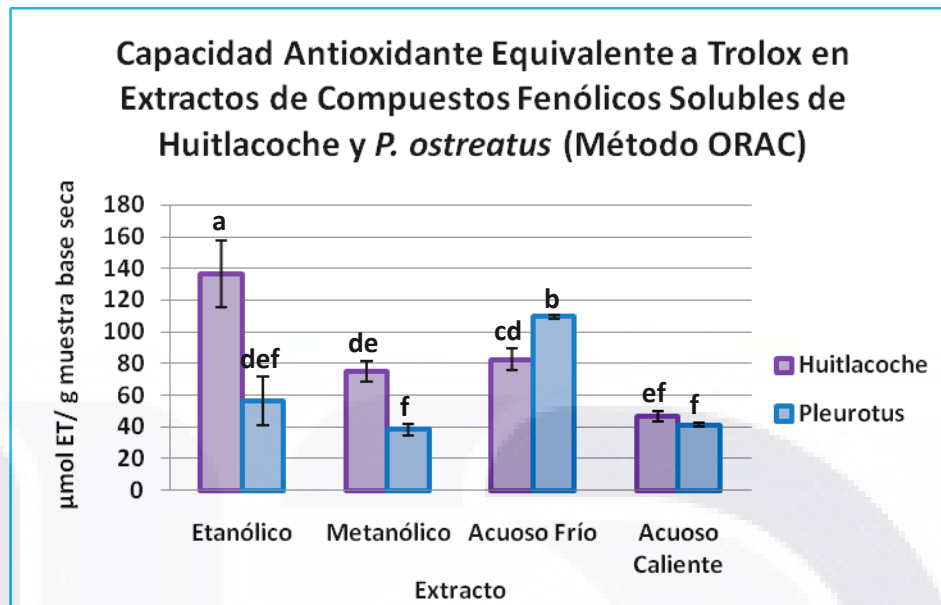


Figura 23. En la gráfica se muestran los resultados de capacidad antioxidante en extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *P. ostreatus* obtenidos por el método ORAC. Cada barra representa la media de dos repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 13.62%.

8. 5. 2. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

Se determinó la capacidad antioxidante mediante método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) en los extractos de compuestos fenólicos insolubles (únicamente en la melanina extraída de huitlacoche y melanina sintética). Los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por miligramo de melanina, y micromoles equivalentes de Trolox procedentes de melanina por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET}/\text{mg}$ de melanina y $\mu\text{mol ET}$ procedentes de melanina/g muestra base seca). Estos se muestran a continuación:

Tabla 17. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox por Método ORAC en Melanina		
Muestra	$\mu\text{mol ET}/\text{mg}$ de melanina	$\mu\text{mol ET}$ procedentes de melanina/g muestra base seca
Melanina sintética	1.9 ± 0.23 a	*
Melanina extracción 1	0.1 ± 0.009 c	1.3 ± 0.11 b
Melanina extracción 2	1.2 ± 0.07 b	13.1 ± 0.77 a
Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes.		
Prueba Tukey, $\alpha=0.05$. Coeficiente de variabilidad, 12.88%. Prueba T-pareada, $\alpha=0.05$. Valor $P=0.001$. *El dato no existe ya que se trata de un estándar.		

A continuación se muestran los resultados representados en gráfica de barras:

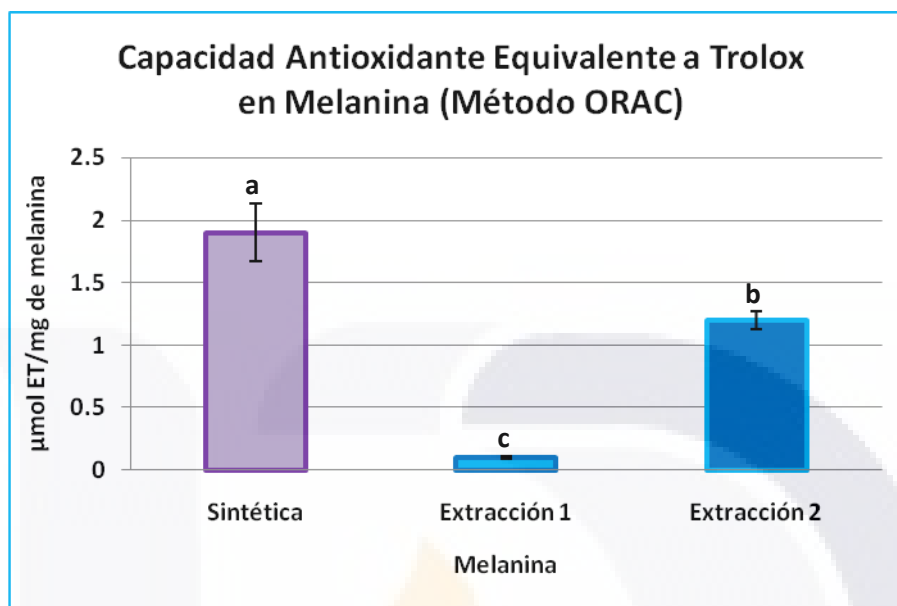


Figura 24. En la gráfica se muestran los resultados de capacidad antioxidante en melanina obtenidos por el método ORAC. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 12.88%.

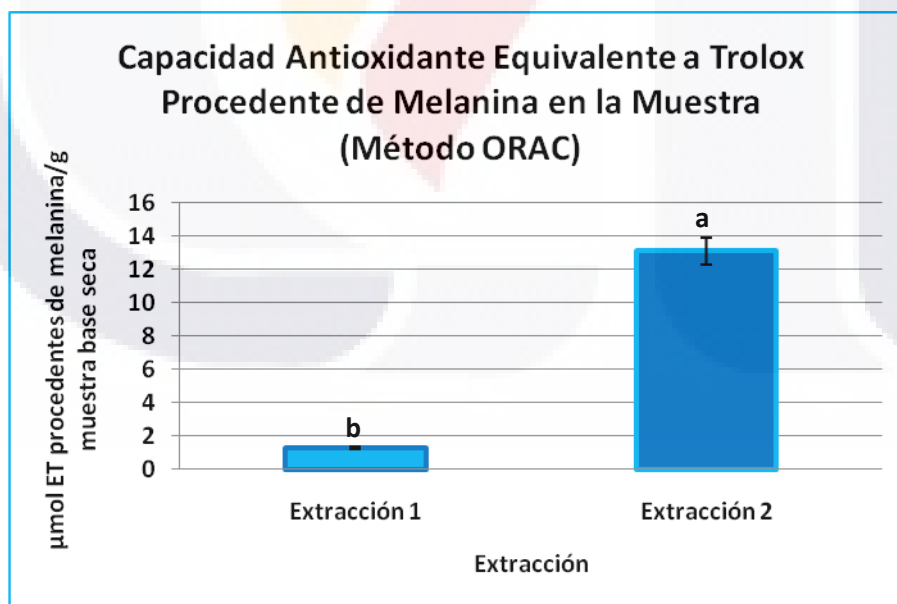


Figura 25. En la gráfica se muestran los resultados de capacidad antioxidante procedente de melanina en la muestra obtenidos por el método ORAC. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba T-pareada, $\alpha=0.05$). Valor P=0.001.

8. 5. 3. Medición de la Capacidad de los Extractos de Inducir Motilidad Intestinal

8. 5. 3. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

Se determinó la capacidad de inducir motilidad intestinal en los extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (extracto etanólico, metanólico, acuoso frío y caliente). Los resultados de la tensión media de la contracción fueron expresados en gramos fuerza (gf). En las tablas y graficas siguientes se muestran los efectos (aumento de la tensión media de la contracción) de cada extracto desde la tensión basal (sin estímulo por parte del extracto) hasta la concentración de 50 mg/ml. También se muestra el efecto del control de acetilcolina.

Extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de huitlacoche:

Tabla 18. Tensión Media de la Contracción (gf) Bajo Estímulo de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche				
Concentración del extracto	Extracto etanólico	Extracto metanólico	Extracto acuoso frío	Extracto acuoso caliente
Sin extracto (tensión basal)	2.044 ± 0.070 b	1.834 ± 0.493 a	2.091 ± 0.295 a	2.096 ± 0.29 b
0.5 mg/mL	2.2 ± 0.175 b	1.928 ± 0.523 a	2.203 ± 0.333 a	2.229 ± 0.297 b
5.0 mg/mL	2.307 ± 0.357 b	2.057 ± 0.596 a	2.303 ± 0.355 a	2.242 ± 0.185 b
50 mg/mL	2.92 ± 0.387 a	2.785 ± 0.819 a	2.837 ± 0.538 a	2.896 ± 0.22 a
	Se muestran los promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes. Prueba Tukey, $\alpha=0.05$.			
	Coficiente de variabilidad, 11.83%.	Coficiente de variabilidad, 28.90%.	Coficiente de variabilidad, 16.63%.	Coficiente de variabilidad, 10.68%.

A continuación se muestran los resultados representados en gráficas de barras:

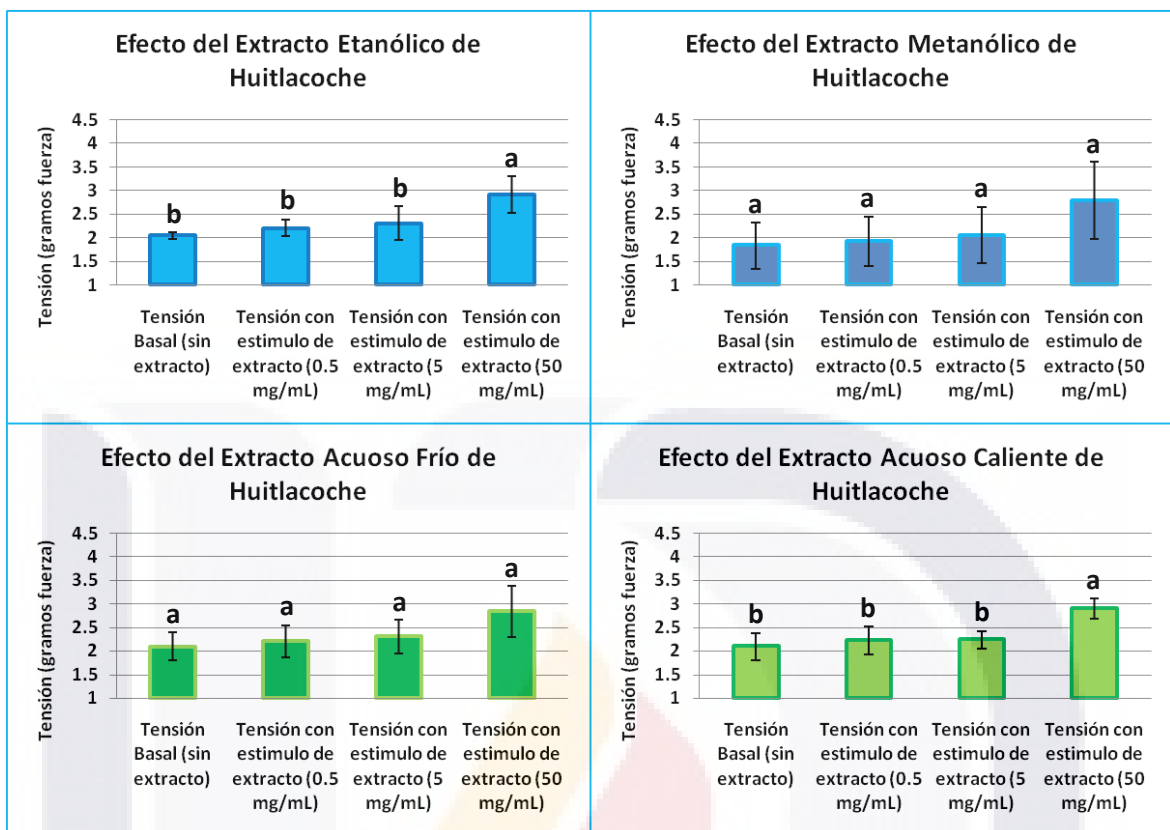


Figura 26. En las gráficas se muestran los efectos de los extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de huitlacoche sobre la movilidad del intestino de rata (tensión media de la contracción). Se muestran los promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Cada barra representa la media de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $\alpha=0.05$). Coeficientes de variabilidad: extracto etanólico, 11.83%; extracto metanólico, 28.90%; extracto acuoso frío, 16.63%; extracto acuoso caliente, 10.68%.

Extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de *Pleurotus ostreatus*:

Tabla 19. Tensión Media de la Contracción (gf) Bajo Estímulo de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de <i>P. ostreatus</i>				
Concentración del extracto	Extracto etanólico	Extracto metanólico	Extracto acuoso frío	Extracto acuoso caliente
Sin extracto (tensión basal)	2.121 ± 0.095 a	1.958 ± 0.099 b	2.003 ± 0.125 b	2.122 ± 0.259 b
0.5 mg/mL	2.236 ± 0.111 a	2.075 ± 0.14 a b	2.154 ± 0.169 b	2.3 ± 0.21 b
5.0 mg/mL	2.353 ± 0.233 a	2.058 ± 0.155 a b	2.241 ± 0.198 b	2.472 ± 0.257 b
50 mg/mL	2.651 ± 0.487 a	2.307 ± 0.185 a	3.069 ± 0.34 a	3.328 ± 0.445 a
	Se muestran los promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes. Prueba Tukey, $\alpha=0.05$.			
	Coeficiente de variabilidad, 11.96%.	Coeficiente de variabilidad, 7.08%.	Coeficiente de variabilidad, 9.43%.	Coeficiente de variabilidad, 12.00%.

A continuación se muestran los resultados representados en gráficas de barras:

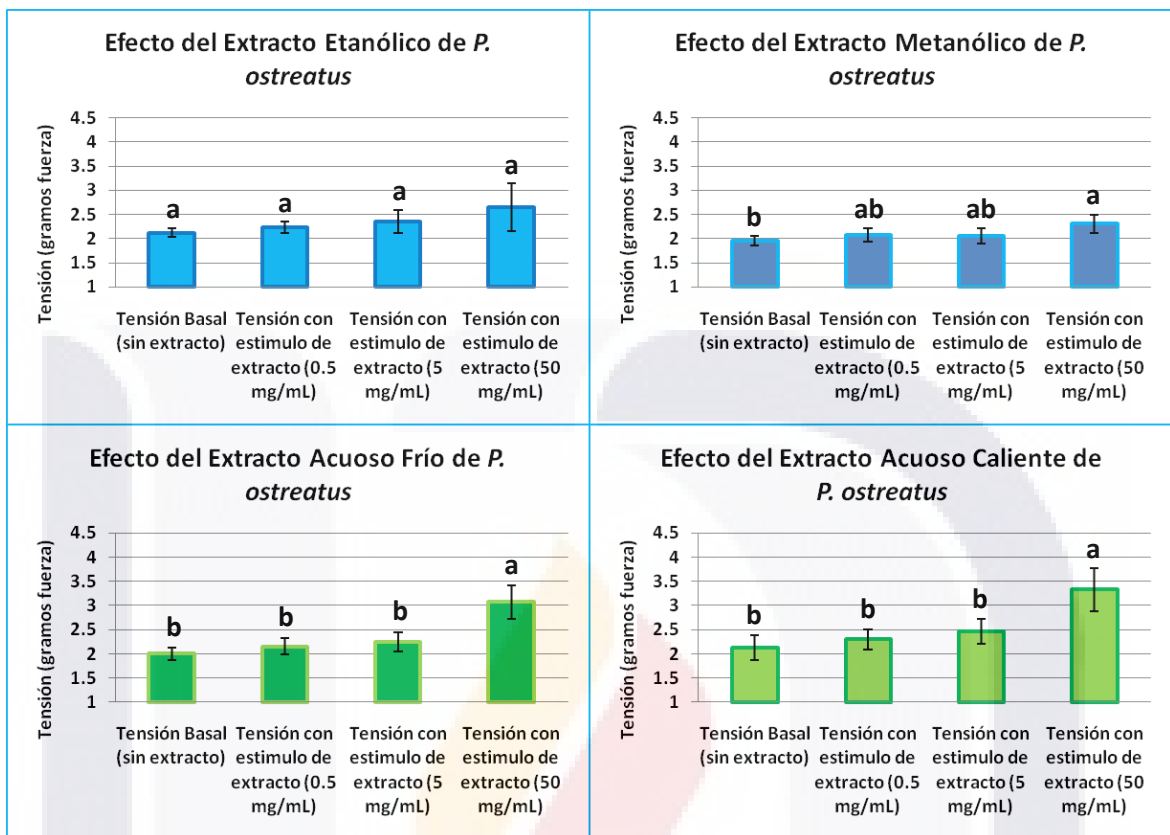


Figura 27. En las gráficas se muestran los efectos de los extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de *P. ostreatus* sobre la movilidad del intestino de rata (tensión media de la contracción). Se muestran los promedios de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $\alpha=0.05$). Coeficientes de variabilidad: extracto etanólico, 11.96%; extracto metanólico, 7.08%; extracto acuoso frío, 9.43%; extracto acuoso caliente, 12.00%.

Control de acetilcolina:

Tabla 20. Tensión Media de la Contracción (gf) Bajo Estímulo del Control de Acetilcolina	
Tensión basal	2.083 \pm 0.088 b
Tensión con estímulo de Acetilcolina 1 x 10⁻⁶ M (dentro del baño de órganos)	3.54 \pm 0.461 a

Se muestran los promedios de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba T-pareada, $\alpha=0.05$). Valor P=0.006.

A continuación se muestran los resultados representados en gráfica de barras:

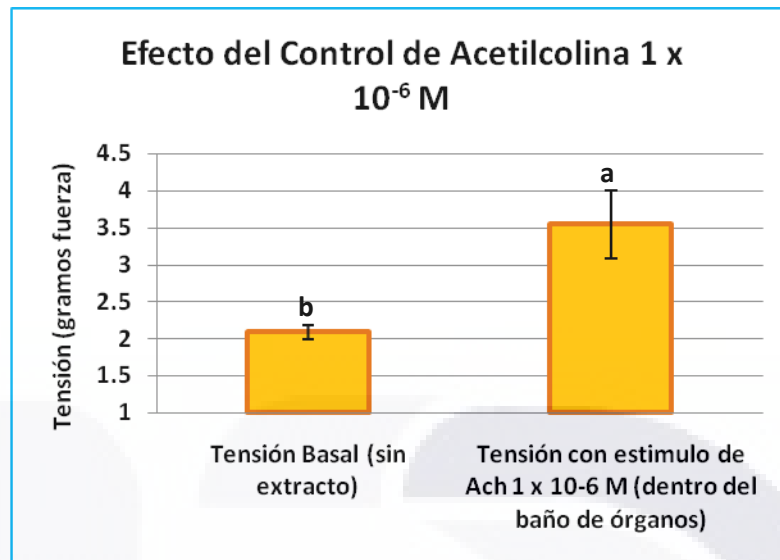


Figura 28. En la gráfica se muestra el efecto del control de acetilcolina sobre la movilidad del intestino de rata (tensión media de la contracción). Se muestran los promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Cada barra representa la media de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba T-pareada, α=0.05). Valor P=0.006.

Se realizó una comparación estadística entre los efectos obtenidos con los extractos, el control de acetilcolina y la tensión basal, lo anterior por cada concentración en que se usó el extracto. Los resultados se muestran a continuación:

Extracto	Concentración del extracto		
	0.5 mg/mL	5.0 mg/mL	50 mg/mL
Etanólico de huitlacoche	2.2 ± 0.175 b	2.307 ± 0.357 b	2.92 ± 0.387 a b
Metanólico de huitlacoche	1.928 ± 0.523 b	2.057 ± 0.596 b	2.785 ± 0.819 a b
Acuoso frío de huitlacoche	2.203 ± 0.333 b	2.303 ± 0.355 b	2.837 ± 0.538 a b
Acuoso caliente de huitlacoche	2.229 ± 0.297 b	2.242 ± 0.185 b	2.896 ± 0.22 a b
Tensión basal*	2.083 ± 0.088 b	2.083 ± 0.088 b	2.083 ± 0.088 b c
Control de acetilcolina*	3.54 ± 0.461 a	3.54 ± 0.461 a	3.54 ± 0.461 a
Etanólico de <i>P. ostreatus</i>	2.236 ± 0.111 b	2.353 ± 0.233 b	2.651 ± 0.487 a b
Metanólico de <i>P. ostreatus</i>	2.075 ± 0.14 b	2.058 ± 0.155 b	2.307 ± 0.185 b c
Acuoso frío de <i>P. ostreatus</i>	2.154 ± 0.169 b	2.241 ± 0.198 b	3.069 ± 0.34 a b
Acuoso caliente de <i>P. ostreatus</i>	2.3 ± 0.21 b	2.472 ± 0.257 b	3.328 ± 0.445 a
*Valor constante.	Se muestran los promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes. Prueba Student-Newman-Keuls, α=0.05.		
	Coficiente de variabilidad, 12.56%.	Coficiente de variabilidad, 13.69%.	Coficiente de variabilidad, 15.61%.

A continuación se muestran los resultados representados en gráficas de barras:

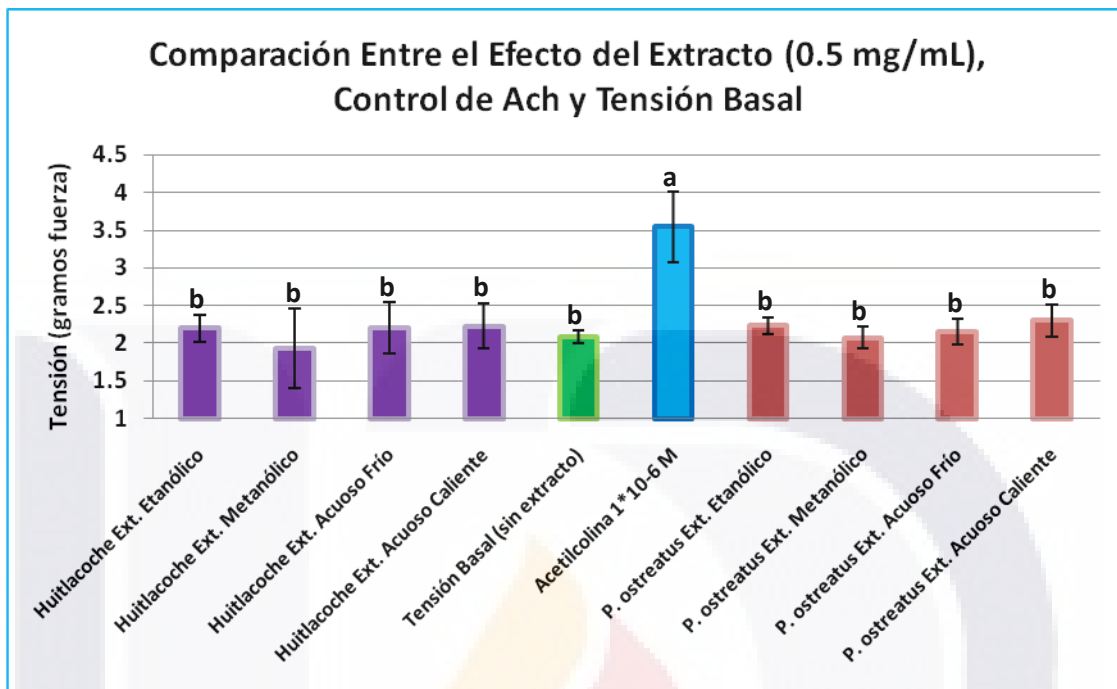


Figura 29. En la gráfica se muestra la comparación estadística entre el efecto de los extractos concentrados a 0.5 mg/mL, el control de acetilcolina y la tensión basal. Se muestran los promedios de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 12.56%.

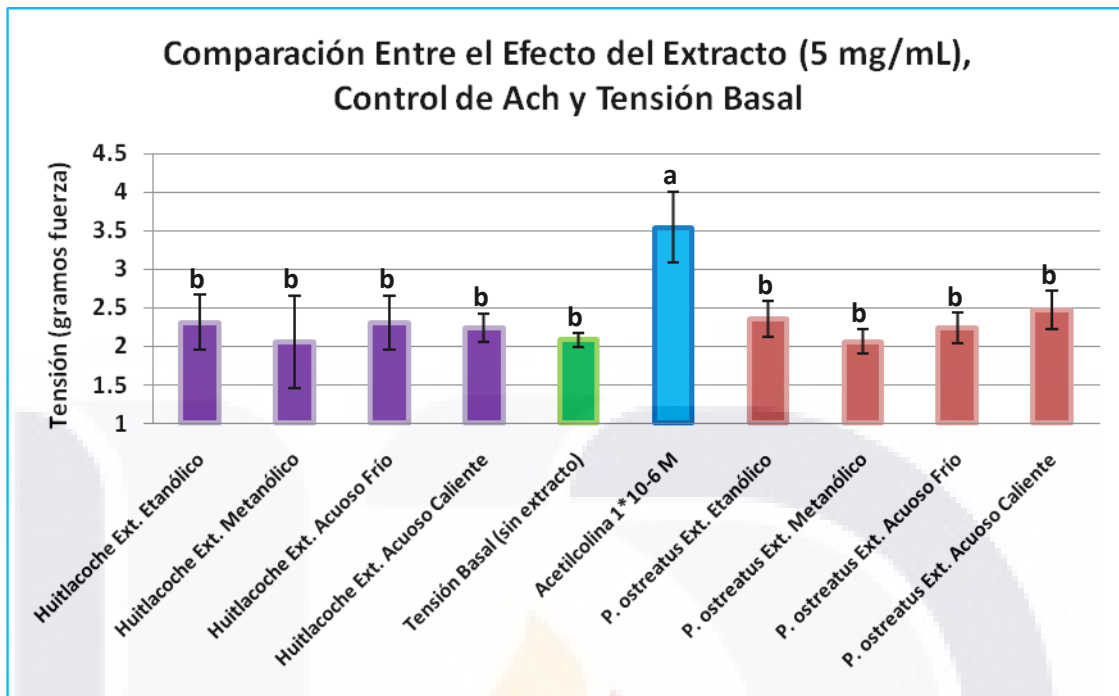


Figura 30. En la gráfica se muestra la comparación estadística entre el efecto de los extractos concentrados a 5.0 mg/mL, el control de acetilcolina y la tensión basal. Se muestran los promedios de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 13.69%.

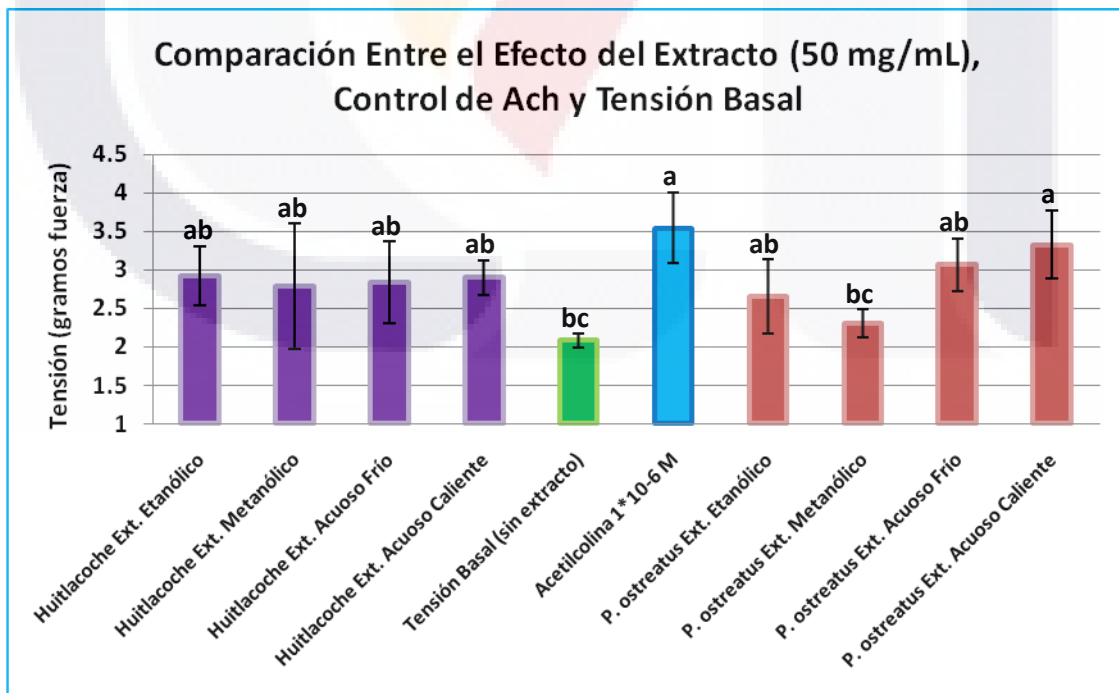


Figura 31. En la gráfica se muestra la comparación estadística entre el efecto de los extractos concentrados a 50 mg/mL, el control de acetilcolina y la tensión basal. Se muestran los promedios

de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Cada barra representa la media de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Prueba Student-Newman-Keuls, $\alpha=0.05$). Coeficiente de variabilidad, 15.61%.

8. 5. 3. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

No se encontró efecto alguno sobre la motilidad del intestino de rata por parte de las suspensiones de melanina extraída de huitlacoche (extracción 1 y extracción 2) y melanina sintética. Lo anterior en ninguna de las tres concentraciones usadas (0.004, 0.04 y 0.4 mg/mL).



9. DISCUSIONES

9. 1. Obtención de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles.

9. 1. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

En nuestro trabajo se utilizaron cuatro tipos de extracciones: etanólica, metanólica, acuosa fría y acuosa calientes. Según la literatura consultada (**Lee y col., 2007; Puttaraju y col., 2006; Lo y Cheung, 2005; Yang y col., 2002; Mau y col., 2001**), éstas son de las más concurridas para obtener compuestos fenólicos solubles de hongos, así como para la evaluación de sus propiedades nutraceuticas. En huitlacoche se obtuvieron rendimientos de 13.45% en el extracto etanólico, 17.54% en el metanólico, 29.46% en el acuoso frío y 29.53% en el acuoso caliente. Mientras que en *Pleurotus ostreatus* los rendimientos fueron del 11.74% en el extracto etanólico, 20.5% en el metanólico, 56.18% en el acuoso frío y 36.37% en el acuoso caliente. En general se observa un mayor rendimiento en ambos extractos acuosos en los dos hongos, siendo mayor en el acuoso caliente en el caso de huitlacoche, sin que existieran diferencias estadísticas significativas con el acuoso frío del mismo. En cuanto a *Pleurotus ostreatus*, el acuoso frío obtuvo un mayor rendimiento en comparación con el acuoso caliente, observándose diferencias estadísticas significativas entre ambos.

Por otro lado, fue mayor el rendimiento en todos los extractos de *Pleurotus ostreatus* si se comparan con su contraparte en huitlacoche, exceptuando el extracto etanólico en el cual el huitlacoche obtuvo un mayor rendimiento sin que existieran diferencias estadísticas significativas. Lo anterior nos habla que *Pleurotus ostreatus* posee un mayor número de compuestos solubles en los solventes antes mencionados, o es más sensible a las extracciones. El hecho de que *Pleurotus ostreatus* sea más sensible a las extracciones en comparación al huitlacoche, puede deberse a las estructuras de tales organismos. Profundizando mas, el huitlacoche es el cuerpo fructífero joven del hongo *Ustilago maydis* (**Valverde y col., 1995**), el cual está formado por sacos llamados agallas que contienen una gran cantidad de esporas, las cuales tiene funciones reproductivas y de resistencia, lo cual hace difícil la extracción de compuestos. Además de las estructuras de resistencia o esporas, el huitlacoche contiene un pigmento color negro llamado melanina, el cual otorga protección contra una gran variedad de factores ambientales como el ataque de enzimas líticas producidas por microorganismos, la desecación, la radiación de la luz visible y

ultravioleta, entre otros (**Butler y col., 2005**). En cuanto a *Pleurotus ostreatus*, lo que se consume también es el cuerpo fructífero, sin embargo a diferencia del huitlacoche, éste posee un mayor número de tejidos sensibles ya que no se trata solo de un saco con esporas, además de que en éste no se observa ninguna estructura melanizada, lo cual lo hace más susceptible a factores ambientales. De esta forma, *Pleurotus ostreatus* a diferencia de huitlacoche, podría quedar más expuesto en una extracción como las realizadas en nuestro estudio, arrojando un mayor rendimiento de los compuestos que pudieron ser solubilizados y extraídos.

Es llamativo el rendimiento que se obtuvo en el extracto acuoso frío de *Pleurotus ostreatus*, ya que es más de la mitad del peso seco de la muestra (56.18%), sin embargo ya han sido reportados rendimientos cercanos como son los casos de *Termitomyces heimii*, *Helvella crispa*, *Lentius sajor-caju*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus djamor* y *Auricularia polytricha* (48, 45, 49, 42, 40 y 43% respectivamente; **Puttaraju y col., 2006**), utilizándose extracciones acuosas calientes. *Hypsizigus marmoreus* u hongo cabeza de mono, ha sido extraído con etanol, agua fría y agua caliente obteniéndose rendimientos del 17.1%, 41.3% y 48.2% respectivamente (**Lee y col., 2007**), los cuales son muy similares a los rendimientos obtenidos en *Pleurotus ostreatus* en el caso de los extractos acuosos, y a huitlacoche en el caso del extracto etanólico. Para extractos metanólicos se han reportado hongos como los de invierno blanco y amarillo ambos *Flammulina velutipes*, que alcanzan rendimientos de 38.1% y 43.9% respectivamente (**Yang y col., 2002**), y son muy superiores a los obtenidos por nosotros en ambos hongos. Algunos otros extractos metanólicos que han ofrecido rendimientos similares a los nuestros son los de *Lentinula edodes* o Shiitake con 15.9%-18.8%, *Pleurotus cystidiosus* u hongo abulón con 19.5% y *Pleurotus ostreatus* con 16.9% (**Yang y col., 2002**). También se han reportado hongos con rendimientos inferiores en extractos metanólicos como *Auricularia mesenterica* u hongo oreja negra, *Auricularia fuscusuccinea* cepa café u hongo oreja Jin, *Auricularia fuscusuccinea* cepa blanca u hongo oreja nevada y *Tremella fuciformis* u hongo oreja plateada, los cuales reportan rendimientos de 4.5%-11.57% (**Mau y col., 2001**).

De los datos anteriormente mencionados, se puede observar que tanto el huitlacoche como *Pleurotus ostreatus* poseen rendimientos favorables de extracción, los cuales son comparables a los de otros hongos conocidos por sus capacidades y propiedades

nutracéuticas como los mencionados anteriormente. Lo anterior orienta a nuestros objetos de estudio a niveles favorables de compuestos fenólicos, así como de sus propiedades nutracéuticas.

9. 1. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

Las melaninas son macromoléculas formadas por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos. Comúnmente los pigmentos resultantes son marrones o negros, aunque también han sido observados otros colores. Entre sus principales características se encuentran la resistencia a la degradación por ácidos calientes, soluciones alcalinas concentradas calientes e insolubilidad en solventes orgánicos y acuosos (**Jacobson, 2000**), lo cual hace muy complicado su extracción y aislamiento.

Los protocolos para la extracción y aislamiento de melanina tienen semejanzas entre sí. En resumen, primero la melanina es extraída y posteriormente es purificada; los reactivos y compuestos usados dependen del material biológico del que se parta. En nuestro estudio se logró la extracción y aislamiento de melanina mediante un protocolo propuesto por **Harki y col. (1997)**, el cual usaron para extraer melanina de trufa (*Tuber melanosporum*). A *grosso modo*, el protocolo consiste en una digestión alcalina de la muestra y posterior purificación mediante hidrólisis ácida y lavados con solventes orgánicos. La digestión alcalina se realiza con la finalidad de solubilizar la melanina y así poderla extraer; mientras que la hidrólisis ácida y los lavados con solventes orgánicos se realizan para eliminar otras moléculas con las que la melanina pudiera venir asociada, tal es el caso de carbohidratos, proteínas y lípidos. Las bases de este protocolo han sido aplicadas para la extracción y aislamiento de melanina en otros materiales biológicos de origen vegetal o fúngico; algunos ejemplos son hojas de Té (**Hung y col., 2004; Hung y col., 2002**), micelio del hongo *Aspergillus nidulans* (**Goncalves y Pombeiro-Sponchiado, 2005**), el hongo endofítico *Phyllosticta capitalensis* (**Suryanarayanan y col., 2004**), semillas de *Osmanthus fragrans* (**Wang y col., 2006**), y *Tuber melanosporum* o trufa (**Harki y col., 1997; De Angelis y col., 1996**). Para materiales biológicos de origen animal también se han aplicado las bases de este protocolo, sin embargo la forma de extracción es diferente. Se tiene el caso de la extracción de melanina de *Gallus gallus domesticus* Brisson o gallina sedosa de huesos negros; en la cual en lugar de utilizar una digestión alcalina se utiliza una digestión enzimática y posterior purificación con solventes orgánicos (**Tu y col., 2009; Chen y col., 2008**). Otro ejemplo es la extracción de melanina de mosca

(*Drosophila melanogaster*), en la cual se utiliza una hidrólisis ácida prolongada para romper el tejido y posterior purificación con solventes orgánicos (Latocha y col., 2000).

Tabla 22. Rendimiento (%) de Extracción de Melanina en Literatura		
Material Biológico	Rendimiento (%) de extracción	Fuente bibliográfica
Hojas de Té negro	1.21%	Hung y col., 2002
Hojas de Té (<i>Thea sinensis</i>)	1.9%	Hung y col., 2004
Semillas de <i>Osmanthus fragrans</i>	0.34%	Wang y col., 2006
Micelio del hongo <i>Aspergillus nidulans</i>	9.45%	Goncalves y Pombeiro-Sponchiado, 2005
Trufa (<i>Tuber melanosporum</i>)	Peridio o pericarpio	De Angelis y col., 1996
	Gleba o endocarpio	
Mosca (<i>Drosophila melanogaster</i>)	4.1-6.3%	Latocha y col., 2000
Gallina sedosa de huesos negros (<i>Gallus gallus domesticus</i> Brisson)	Periostio	Chen y col., 2008
	Ovario o testículo	
	Tráquea	
	Piel	
	Músculo	
Gallina sedosa de huesos negros (<i>Gallus gallus domesticus</i> Brisson), músculo	0.12%	Tu y col., 2009

Nuestros rendimientos fueron del 1.22% en la extracción 1 y del 1.05% en la extracción 2, los cuales son muy similares y superiores a los rendimientos en los materiales biológicos mencionados en la Tabla 22; con excepción del micelio del hongo *Aspergillus nidulans* y mosca (*Drosophila melanogaster*). Es probable que en el caso de *Aspergillus nidulans* la extracción haya sido más eficiente; esto ya que no presenta estructuras de resistencia o esporas que soportarían más los procesos de extracción. En cuanto a la extracción en mosca (*Drosophila melanogaster*), los cuerpos fueron sometidos a procesos de hidrólisis ácida muy prolongados, lo que probablemente fue muy eficiente ya que sus células no tienen estructuras de protección como paredes de celulosa o quitina; como en el caso de los materiales vegetales o fúngicos. En el caso de la gallina, es probable que haya presentado rendimientos cercanos e inferiores a los nuestros, ya que se utilizó una digestión enzimática para liberar la melanina, esto hace que solo ciertas estructuras

proteicas específicas para las enzimas sean desarticuladas, liberando melanina solo de estas y no de la totalidad del tejido.

Como se pudo observar, el rendimiento de la extracción de melanina en huitlacoche es comparable con el de otros materiales biológicos, pero es aún más importante el saber de la existencia de ésta en nuestro objeto de estudio. Esto orienta al huitlacoche a poseer propiedades nutraceuticas importantes, ya que a las melaninas se les ha conferido una gran cantidad de beneficios al actuar como radioprotectores, antioxidantes, quelantes de metales, secuestradores de radicales libres e inmunomoduladores entre otros beneficios (Tu y col., 2009; Aghajanyan y col., 2005; Hung y col., 2002). Es importante mencionar que es necesario el desarrollo de protocolos de extracción más eficientes, ya que en nuestro caso no toda la melanina del material pudo ser extraída. Lo anterior debido a que el material residual así como los diferentes subproductos o residuos del protocolo de extracción presentaban una fuerte pigmentación negra, lo que nos habla de la presencia melanina. Estos últimos también fueron analizados en cuanto a sus compuestos fenólicos y propiedades nutraceuticas.

9. 2. Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales

9. 2. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

En huitlacoche, los niveles de compuestos fenólicos totales fueron de 6.8, 4.2, 4.2, y 3.8 mg EAG/g de muestra base seca; en los extractos acuoso frío, metanólico, acuoso caliente y etanólico respectivamente. En el caso de *Pleurotus ostreatus*, los niveles fueron de 7.9, 4.4, 2.6 y 2.3 mg EAG/g de muestra base seca; en los extractos acuoso frío, acuoso caliente, metanólico y etanólico respectivamente. Estos resultados nos hablan en parte de la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en ambos hongos, ya que en ambos hongos fue mayor la cantidad de compuestos extraídos con agua que con ambos alcoholes. Por otro lado, los resultados elevados en los extractos acuosos, también pudieron deberse a interferencias que el reactivo de Folin-Ciocalteu puede tener con otras moléculas orgánicas, como azúcares y ácido ascórbico (Prior y col., 2005). El caso de los azúcares es más probable ya que tanto el huitlacoche como *Pleurotus ostreatus* y los hongos en general, poseen elevadas cantidades de carbohidratos, principalmente sacáridos de bajo peso molecular y polisacáridos no digeribles (Bonatti y

col., 2004; Mizuno, 1995; Valverde y col., 1995). En cuanto al ácido ascórbico o vitamina C, la interferencia de este compuesto en la reacción es menos probable, ya que aunque se encuentra presente en los hongos, es vulnerable a las pérdidas post cosecha debido a que los hongos tienen muy alta actividad de la enzima polifenol oxidasa, promoviendo su oxidación (Arora, 2004).

El calentamiento también es un factor importante en los niveles de compuestos fenólicos totales, ya que se observa una disminución del 38% en huitlacoche y del 44% en *Pleurotus ostreatus*; con respecto al extracto acuoso frío que fue el que obtuvo los mayores niveles. Posiblemente causado por la degradación de estos compuestos. Otra posible opción, es que en el caso de que los valores fueran sobrestimados en el extracto acuoso frío a causa de la presencia de ácido ascórbico; el calentamiento actuó principalmente sobre este compuesto, eliminando su presencia ya que se trata de un compuesto muy termolábil.

Los niveles de compuestos fenólicos totales que encontramos en huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* se encuentran en los rangos de 3.8-6.8 y 2.3-7.9 mg/g base seca respectivamente, los cuales son muy similares a los niveles encontrados en otros estudios de huitlacoche (3.9-6.4 mg/g base seca; **Beas-Fernández y col., 2008**) y *Pleurotus ostreatus* (2.65 y 4.27 mg/g base seca; **Yang y col., 2002; Dubost y col., 2007**). En comparación con otros hongos comestibles como *Grifola frondosa* o Maitake, *Lentinula edodes* o Shiitake (4.17 y 4.32 mg/g base seca respectivamente; **Dubost y col., 2007**), *Auricularia polytricha* u hongo oreja roja (2.3-3.2 mg/g base seca; **Puttaraju y col., 2006**) y los hongos de invierno blanco y amarillo, ambos *Flammulina velutipes* (3.19 y 4.06 mg/g base seca respectivamente; **Yang y col., 2002**); nuestros resultados son muy similares. Algunos otros hongos comestibles que reportan valores menores a los encontrados por nosotros son, *Pleurotus cystidiosus* u hongo abulón (1.99 mg/g base seca; **Yang y col., 2002**), *Auricularia mesenterica* u hongo oreja negra, *Auricularia fuscusuccinea* cepa café u hongo oreja Jin, *Auricularia fuscusuccinea* cepa blanca u hongo oreja nevada y *Tremella fuciformis* u hongo oreja plateada (0.20, 0.42, 1.01, 0.063 mg/g base seca respectivamente; **Mau y col., 2001**). Por otro lado, también se han reportado hongos comestibles con valores superiores a los encontrados por nosotros, como son los casos del champiñón, hongo café o Crimini y hongo Portobello, los tres *Agaricus bisporus* (8.0, 9.89 y 10.65 mg/g base seca respectivamente; **Dubost y col., 2007**); también *Agrocybe*

aegerita (15.3 mg/g base seca; **Lo y Cheung, 2005**), *Termitomyces heimii*, *Helvella crispa*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus djamor* (11.2-37.0, 4.0-35.0, 7.4-14.3 y 3.6-13.3 mg/g base seca respectivamente; **Puttaraju y col., 2006**) e *Hypsizigus marmoreus* u hongo cabeza de mono (22.05-127.20 mg/g base seca; **Lee y col., 2007**).

En comparación con otros alimentos como frijol común (1.41-1.98 mg/g base seca; **Guevara-Lara y col., 2006**), dátiles suaves, semi-secos y secos (0.028-0.048, 0.043-0.066 y 1.41 mg/g base seca respectivamente; **Biglari y col., 2008**), nuestros resultados reportan niveles mayores. Otros como el perejil, orégano (18.0 y 60.7 mg/g base seca respectivamente; **Jimenez-Alvarez y col., 2008**), mora, frambuesa negra, frambuesa roja, fresa (13.47, 15.47, 13.46 y 10.33 mg/g base seca respectivamente; **Wang y Lin, 2000**), café de grano molido (41-58 mg/g base seca; **Brezová y col., 2009**), colza (13.78-18.21 mg/g de semilla; **Szydłowska-Czerniak y col., 2010**), ajo, coliflor, brócoli, jitomate, pimiento verde y rojo (18.9, 14.0, 18.1, 10.7, 15.1 y 12.6-19.3 mg/g base seca respectivamente; **Stratil y col., 2006**) presentan valores superiores a los nuestros. Por otro lado, también han sido reportados alimentos con valores similares a los obtenidos en nuestro estudio, como son los de frijol pinto y negro crudos (6.8 y 7.5 mg/g base seca respectivamente; **Xu y Chang, 2009**), frijol de soya Virginia (2.9-3.9 mg/g de semilla; **Chung y col., 2008**), papa, calabacín (4.5-6.8 y 7.7 mg/g base seca; **Stratil y col., 2006**), jengibre, comino y pimienta verde, negra y blanca (6.3, 2.3, 3.8 y 7.8 mg/g base seca respectivamente; **Shan y col., 2005**).

Los datos anteriores demuestran en parte el potencial nutracéutico del huitlacoche, ya que en el aspecto de los compuestos fenólicos totales alcanza niveles comparables con los de *Pleurotus ostreatus*, otros hongos como Maitake y Shiitake, y vegetales o frutos los cuales son conocidos por sus capacidades y propiedades nutracéuticas. Por otro lado, a pesar de que también fueron mostrados otros alimentos que presentan valores superiores a los encontrados en nuestro estudio, hay que tomar en cuenta el tipo de extracción, ya que en varios de los trabajos citados utilizaron protocolos de extracción mas elaborados y complejos que los utilizados por nosotros, lo cual pudo ser un factor determinante en que los valores citados fueran superiores a los encontrados en nuestro estudio.

9. 2. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

La determinación de compuestos fenólicos totales en melanina y en los residuos de su extracción se realizó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu; esto fue un proceso complicado debido sus características de insolubilidad en agua o solventes orgánicos. Para el análisis se prepararon soluciones alcalinas (KOH 2 M) de melanina y de los residuos; ya que en este agente es en el único en el que se pueden disolver. Lo anterior ha quedado demostrado ya que en la mayoría de los protocolos de extracción de melanina en materiales vegetales o fúngicos, las soluciones alcalinas concentradas han sido usadas para su disolución y extracción (**Wang y col., 2006; Goncalves y Pombeiro-Sponchiado, 2005; Hung y col., 2004; Suryanarayanan y col., 2004; Hung y col., 2002; Harki y col., 1997; De Angelis y col., 1996**). Por otro lado, el hecho de que la melanina y los residuos se encontraran disueltos en un álcali no afecto; debido a que un pH alcalino es importante para el desempeño de la reacción, ya que por el contrario un pH ácido produce un aletargamiento de ésta (**Jimenez-Alvarez y col., 2008; Prior y col., 2005**).

En cuanto a la melanina, la preparación de las soluciones alcalinas presento algunas complicaciones; ya que no toda la melanina destinada para preparar las soluciones pudo ser disuelta. Posiblemente porque se trataba de melanina muy polimerizada y de alto peso molecular, provocado por los procesos de disolución y precipitación que conlleva el protocolo de extracción y aislamiento. Pese a esto, el 75% de la melanina de la extracción 1 pudo ser disuelta, mientras que en la extracción 2 pudo disolverse el 95%. En cuanto a la melanina sintética utilizada como comparativo; el 100% de ésta pudo ser disuelta. A partir de estas soluciones se realizaron los análisis; y como causa de los problemas en la disolución de la melanina, los resultados de compuestos fenólicos totales (mg EAG) fueron plasmados de tres formas: por miligramo de melanina soluble, por miligramo de melanina extraída y compuestos fenólicos totales procedentes de melanina por gramo de muestra.

Los resultados obtenidos para compuestos fenólicos totales por miligramo de melanina soluble (mg EAG/mg de melanina soluble) fueron de 0.9 para la sintética, y de 1.0 para la extracción 1 y 2; lo cual indica que toda la melanina solubilizada de nuestras extracciones son compuestos fenólicos, mientras que para la melanina sintética solo el 90%. Para los compuestos fenólicos totales por miligramo de melanina extraída (mg EAG/mg de

melanina extraída), los resultados fueron de 0.74 para la extracción 1 y de 0.92 para la extracción 2; lo cual quiere decir que por lo menos el 74% de la melanina en ambas extracciones se trata de compuestos fenólicos. Sin embargo esto no indica que el resto no lo sean; simplemente no pudieron ser solubilizados y por lo tanto analizados. En cuanto a los compuestos fenólicos totales procedentes de melanina en la muestra (mg EAG procedentes de melanina/g de muestra base seca), los resultados fueron de 9.1 para la extracción 1 y de 9.7 para la extracción 2; los cuales son superiores a los obtenidos en los extractos de compuestos fenólicos solubles tanto para huitlacoche como para *Pleurotus ostreatus*. Estos resultados son de esperarse ya que como indica **Jacobson (2000)**, las melaninas son polímeros de compuestos fenólicos. Es importante mencionar que no toda la melanina pudo ser extraída, ya que el material residual (restos celulares) contenía una fuerte pigmentación negra; por lo tanto estos valores podrían aumentar de forma considerable si se desarrollaran protocolos de extracción más eficientes. Por desgracia no se encontró algún material bibliográfico que planteara un trabajo similar con el cual comparar nuestros resultados; sin embargo creemos que estos son favorables ya que averiguamos que la mayor parte de la melanina extraída son compuestos fenólicos; los cuales son la base estructural de las melaninas.

En cuanto a los residuos de la extracción de melanina, estos no presentaron complicaciones al preparar sus soluciones alcalinas utilizadas en el análisis; ya que se disolvieron totalmente a diferencia de la melanina. En este caso los resultados solo fueron reportados como compuestos fenólicos totales por gramo de muestra (mg EAG/g de muestra base seca).

En general no se encontraron diferencias muy marcadas entre las extracciones, pero si entre los residuos. Los niveles más sobresalientes se encuentran en los residuos de la extracción con KOH (digestión alcalina); estos son el sobrenadante de la precipitación de la "melanina cruda" y el agua de los lavados de la "melanina cruda". Los valores para estos fueron de 29.7-30.1 mg EAG/g de muestra base seca en el primero, y de 14.7-17.3 mg EAG/g de muestra base seca para el segundo. Estos valores fueron muy superiores a los obtenidos con los extractos de compuestos fenólicos solubles en ambos hongos, e incluso a los obtenidos en melanina. Posiblemente esto se deba a pequeñas moléculas de melanina de bajo peso molecular, que no alcanzaron a precipitar con el HCl usado para este propósito; en el caso del primer residuo. En el caso del segundo, es posible que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

también se trate de las mismas pequeñas moléculas de melanina que fueron retiradas mediante los lavados con agua destilada. Esta situación no es extraña, ya que en varios de los protocolos de extracción (**Wang y col., 2006; Goncalves y Pombeiro-Sponchiado, 2005; Hung y col., 2004**) se utiliza disolver, precipitar y lavar la melanina en varias ocasiones para eliminar moléculas de melanina de bajo peso molecular, y obtener melanina mas homogénea y de alto peso molecular.

En cuanto a los residuos obtenidos en el proceso de hidrólisis ácida, estos no presentaron niveles importantes; variando de 0.3-1.7 mg EAG/g de muestra base seca en los tres residuos (HCl 7 M utilizado en la hidrolisis acida, HCl 0.01 M y agua destilada de los lavados de “melanina no hidrolizable”). Lo anterior ya que un pH ácido precipita la melanina, y por lo tanto muy poca pudo haber quedado en el sobrenadante. Además de que las moléculas mas pequeñas y que no alcanzan a precipitar con el HCl, ya habían sido retiradas y contadas en el sobrenadante de la precipitación de la “melanina cruda”.

Por último, en los residuos de los lavados con cloroformo, solo se obtuvieron resultados importantes en el agua de los lavados de la melanina; los cuales oscilan de 2.9-4.4 mg EAG/g de muestra base seca. Posiblemente esto se deba a que este proceso implica la disolución de la melanina para ser lavada por el cloroformo, y posteriormente su precipitación (HCl) y lavado (agua destilada). Como se mencionó anteriormente, esto produce la eliminación de pequeñas moléculas de melanina que pudieron ser arrastradas por el agua de los lavados, elevando sus niveles de compuestos fenólicos totales. En cuanto al cloroformo de los lavados y el HCl 7 M para precipitar la solución alcalina de melanina, los resultados fueron poco importantes (0.1-0.3 mg EAG/g de muestra base seca).

Los hallazgos mencionados anteriormente son muy importantes, ya que ahora sabemos que una gran cantidad de compuestos fenólicos se pierde en la primera parte del protocolo de extracción y aislamiento, junto con los residuos. Tales compuestos fenólicos muy probablemente sean parte de la melanina solubilizada y que no alcanza a ser separada; lo cual elevaría considerablemente el contenido de este compuesto en nuestro objeto de estudio. Conociendo lo anterior y la cantidad de melanina que logró extraerse; se puede afirmar que el huitlacoche es un hongo que posee una cantidad formidable de melanina, y que ésta junto con los compuestos fenólicos solubles que el huitlacoche

contiene, conducen a éste a ser un excelente alimento con propiedades nutracéuticas sobresalientes.

9. 3. Evaluación de las Propiedades Nutracéuticas de los Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles

9. 3. 1. Medición de la Capacidad Antioxidante Mediante la Reducción de Radicales Libres (TEAC-DPPH)

9. 3. 1. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

En huitlacoche, los niveles de capacidad antioxidante mediada por TEAC-DPPH fueron de 7.1, 3.9, 3.3 y 0.5 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca; en los extractos acuoso frío, acuoso caliente, metanólico y etanólico respectivamente. Mientras que para *Pleurotus ostreatus*, los niveles fueron de 2.1, 1.0, 0.9 y 0.4 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca; en los extractos acuoso frío, metanólico, acuoso caliente y etanólico respectivamente. En ambos hongos estos niveles presentan una tendencia similar a los obtenidos para compuestos fenólicos totales, ya que en los dos análisis, el extracto acuoso frío exhibe los niveles más altos, mientras que el extracto etanólico los más bajos. En cuanto al extracto acuoso caliente y metanólico, los niveles que presentan en ambos análisis varían, pero siempre tienen los niveles intermedios. Lo anterior indica que la capacidad antioxidante de los extractos en este análisis, es determinada por los compuestos fenólicos que estos contienen. Este fenómeno es de esperarse, ya que en estudios similares en los que se mide compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante por TEAC-DPPH, siempre existe una buena correlación entre ambos niveles (**Szydłowska-Czerniak y col., 2010; Brezová y col., 2009; Zhou y col., 2009; Zielinska y col., 2007**).

Por otro lado, fueron muy superiores los niveles de capacidad antioxidante en todos los extractos de huitlacoche, si se comparan con su contraparte en *Pleurotus ostreatus*. A excepción del extracto etanólico; donde los niveles fueron muy similares aunque el huitlacoche también presenta el nivel más alto. Estas diferencias son muy notables, y no coinciden con las diferencias en sus niveles de compuestos fenólicos totales. Lo anterior puede ser explicado por los diferentes perfiles de compuestos fenólicos que ambos hongos poseen; ya que al tratarse de hongos distintos, es lógico pensar que no contienen

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los mismos compuestos fenólicos desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. La afirmación anterior se sustenta en los trabajos realizados por **Tabart y col. (2009)**, **Stratil y col. (2006)** y **Gil y col. (2000)**; donde diferentes estándares de compuestos fenólicos son probados en su capacidad antioxidante por diferentes métodos (incluyendo TEAC-DPPH), observándose amplias diferencias. De esta manera, el tipo de compuestos fenólicos que una muestra posee, influye de manera importante sobre la capacidad antioxidante de ésta.

Al igual que los niveles de compuestos fenólicos totales, el calentamiento también actúa disminuyendo los niveles de capacidad antioxidante medida por TEAC-DPPH. Tal disminución fue de un 45% en huitlacoche, y del 57% en *Pleurotus ostreatus*; con respecto al extracto acuoso frío que fue el que mostró los mayores niveles. Estos decrementos son cercanos a los obtenidos en compuestos fenólicos totales, por lo tanto es de suponerse que estos tienen una alta correlación con la capacidad antioxidante medida por TEAC-DPPH, y que tal disminución muy probablemente se debió a su degradación causada por el calor.

Por desgracia, no se encontró algún material bibliográfico donde la capacidad antioxidante en hongos fuera medida con el radical DPPH, utilizando una curva de calibración de Trolox para expresar los resultados en equivalentes de este compuesto. Por lo general los resultados eran expresados en el porcentaje de reducción del radical, a una cierta concentración del extracto. Sin embargo, se encontró un trabajo donde se analiza la capacidad antioxidante en hongos, utilizando el radical ABTS y con la expresión de los resultados en equivalentes de Trolox. En el trabajo realizado por **Bor y col. (2006)**, se analizaron extractos acuosos de los hongos *Auricularia auricula-judae* u hongo oreja de Judas, *Lentinula edodes* o Shiitake, *Volvariella volvacea* u hongo de paja y *Flammulina velutipes* u hongo de invierno; obteniéndose resultados de 2.1, 11.58, 7.29 y 34.02 $\mu\text{mol ET/g}$ peso fresco respectivamente (en el caso de *Auricularia auricula-judae* el resultado es en base seca). Estos resultados son similares a los nuestros en el caso de *Auricularia auricula-judae* con *Pleurotus ostreatus* y *Volvariella volvacea* con huitlacoche, pero en el caso de *Lentinula edodes* y *Flammulina velutipes* estos son superiores. En este contexto hay que tomar en cuenta el contenido de humedad, ya que como se mencionó anteriormente los resultados son en peso fresco, por lo cual estos valores podrían aumentar si se expresaran en base seca. Es importante mencionar que ambos métodos

TEAC-DPPH y TEAC-ABTS podrían ser comparados; ya que se ha observado que estos tienen una buena correlación y generalmente producen valores cercanos, debido a que se basan en el mismo mecanismo: reducción de radicales libres usando un antioxidante donador de hidrógeno, y un monitoreo por decremento en la densidad óptica (**Zielinska y col., 2007; Brezová y col., 2009; Tabart y col., 2009**). Sin embargo al tratarse de metodologías distintas, hay que tomar las comparaciones con reservas.

En cuanto a alimentos que no sean hongos, existe bastante información con respecto a su capacidad antioxidante determinada por el método TEAC-DPPH. Un ejemplo en semillas, es el frijol de soya Virginia, que alcanza niveles de capacidad antioxidante de 2.9-4.9 $\mu\text{mol ET/g}$ de semilla (**Chung y col., 2008**), los cuales son similares a los niveles presentados por huitlacoche, pero superiores a los niveles de *Pleurotus ostreatus*. Otro ejemplo son el frijol pinto y negro (*Phaseolus vulgaris* L.) crudos, que alcanzan niveles de 19.1 y 19.35 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente (**Xu y Chang, 2009**), los cuales son superiores a los niveles mostrados por ambos hongos. En frutas de amplio consumo en México como papaya, guayaba, sapote negro, aguacate, mango, fresa y tuna; los niveles fueron de 42.16, 301.35, 73.29, 5.52, 89.24, 189.46 y 7.9 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente (**Corral-Aguayo y col., 2008**). En varias de estas frutas los niveles son bastante superiores a los obtenidos por ambos hongos, lo cual pudo ser influenciado por otros compuestos antioxidantes como los carotenoides, y las vitaminas C y E. Estos compuestos también fueron cuantificados en el estudio citado, y mostraron poseer niveles bastante generosos. A pesar de lo anterior, los niveles obtenidos por huitlacoche son comparables con los de aguacate y tuna, sin embargo en el caso de *Pleurotus ostreatus* sus niveles son inferiores. Para algunas bebidas comerciales como jugo de manzana (Minute Maid), jugo de naranja (Minute Maid), jugo de uva (Carrefour), jugo de vegetales V8 (Cambells), té verde (Lipton) y vino rojo (Merlot 2004, Vallé des Rappel, Chile); los niveles fueron de 0.308, 1.846, 1.046, 0.42, 5.04 y 6.72 $\mu\text{mol ET/mL}$ respectivamente (**Tabart y col., 2009**), los cuales son comparables con los niveles de capacidad antioxidante en ambos hongos, con excepción del té verde y el vino rojo para *Pleurotus ostreatus*, donde los niveles son mayores que en el hongo.

De lo anteriormente mencionado, se puede observar que los niveles de capacidad antioxidante medidos por TEAC-DPPH en ambos hongos, pueden ser superiores o inferiores a los de otros alimentos. Sin embargo el hallazgo de capacidad antioxidante

coloca a nuestros objetos de estudio dentro de los alimentos con propiedades nutraceuticas.

9. 3. 1. 2. Extractos de compuestos fenolicos insolubles

Debido a su insolubilidad, la determinación de capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en melanina y los residuos de su extracción, se baso en la metodología planteada por **Serpen y col. (2007)**, la cual propuso para componentes insolubles de alimentos. En esta metodología la muestra se usa en forma de suspensión, y para la interacción de ésta con el radical libre, se usa agitación en vortex. A diferencia de la cuantificación de compuestos fenolicos totales en estos materiales, no fue recomendable disolver estos en KOH. Lo anterior por que el mecanismo de reacción se basa en la donación de un átomo de hidrógeno por parte del antioxidante, para reducir el radical libre (**Moon y Shibamoto, 2009; Molyneux, 2004**). De esta manera un pH alcalino podría haber afectado la reacción.

Ya que la melanina no tuvo que disolverse, los resultados de capacidad antioxidante ($\mu\text{mol ET}$) fueron expresados de dos formas: por miligramo de melanina, y capacidad antioxidante procedente de melanina por gramo de muestra.

Los resultados obtenidos para capacidad antioxidante por miligramo de melanina ($\mu\text{mol ET/mg}$ de melanina), fueron de 1.6 para la sintética, y de 0.6 y 0.8 para la extracción 1 y 2 respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de compuestos fenolicos por miligramo de melanina extraída (mg EAG/mg de melanina extraída), en los cuales se obtuvieron valores de 0.74 para la extracción 1, y de 0.92 para la extracción 2; observándose la relación que existe entre capacidad antioxidante por TEAC-DPPH, y el contenido de compuestos fenolicos totales. Por otro lado, es visible que ambas extracciones poseen valores inferiores a la sintética, posiblemente porque el proceso de extracción afecto su capacidad antioxidante, ya que este involucra procedimientos químicos muy agresivos. A pesar de esto, nuestros resultados fueron muy superiores a los obtenidos por **Serpen y col. (2007)** para los materiales insolubles de todos los alimentos que probaron. En esta lista se incluye material insoluble de lechuga, jitomate, naranja, cascarilla del grano de café, cascarilla de cacao, cereales de desayuno, corteza de pan, harina de avena, entre otros. Obteniéndose valores en el rango de 0.00034-0.073 $\mu\text{mol ET/mg}$ de material insoluble, siendo el de menor valor la corteza de pan y el de

mayor la cascarilla del grano de café. Con los datos anteriores, nos podemos dar cuenta que es importante la capacidad antioxidante mostrada por la melanina, lo que aporta más indicios de las propiedades nutraceuticas del huitlacoche.

En cuanto a la capacidad antioxidante procedente de melanina en la muestra ($\mu\text{mol ET}$ procedente de melanina/g de muestra base seca), los resultados fueron de 7.3 para la extracción 1 y de 8.8 para la extracción 2. Observándose nuevamente la relación de capacidad antioxidante por TEAC-DPPH, con el contenido de compuestos fenólicos totales. Lo anterior ya que los valores para compuestos fenólicos totales procedentes de melanina en la muestra (mg EAG procedentes de melanina/g de muestra base seca), fueron de 9.1 y 9.7 para la extracción 1 y 2 respectivamente. Por desgracia no se encontró en la literatura un trabajo similar con el cual comparar nuestros resultados. Sin embargo, comparando estos valores con el extracto acuoso frío de huitlacoche ($7.1 \mu\text{mol ET/g}$ base seca), que fue el que mostró el mayor nivel de capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en los extractos de compuestos fenólicos solubles; se puede observar que la melanina brinda una mayor capacidad antioxidante. Aunado a esto, se debe recordar que no toda la melanina pudo ser extraída y que gran parte se pierde en el proceso de extracción, por lo cual la capacidad antioxidante aportada por la melanina en este hongo, podría aumentar considerablemente.

En cuanto a la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en los residuos de la extracción de melanina, los resultados siguen una tendencia muy similar a la de compuestos fenólicos totales. Encontrándose los valores más sobresalientes en los residuos de la extracción con KOH (digestión alcalina), y sin existir diferencias muy marcadas entre ambas extracciones. Lo anterior viene a corroborar la relación de capacidad antioxidante por TEAC-DPPH, y el contenido de compuestos fenólicos totales. En este caso los resultados solo fueron expresados como capacidad antioxidante por gramo de muestra ($\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca).

Como se mencionó anteriormente, los resultados más importantes fueron los mostrados por los residuos de la extracción con KOH (digestión alcalina). Obteniéndose valores de $15.7\text{-}16.0 \mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca para el sobrenadante de la precipitación de la "melanina cruda", y de $8.5\text{-}8.9 \mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca para el agua de los lavados de la "melanina cruda". Al igual que para los compuestos fenólicos totales, estos resultados son superiores a la capacidad antioxidante mostrada en los extractos de

compuestos fenólicos solubles en ambos hongos, y a la de la melanina. Lo anterior posiblemente se debió a la misma razón por la cual los compuestos fenólicos son elevados en estos mismos residuos; pequeñas moléculas de melanina de bajo peso molecular que no alcanzan a ser separadas en el proceso de extracción.

En cuanto a los residuos obtenidos en el proceso de hidrólisis ácida, estos no presentaron niveles importantes; variando de 0.2-1.1 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca en los tres residuos (HCl 7M utilizado en la hidrólisis ácida, HCl 0.01 M y agua destilada de los lavados de la "melanina no hidrolizable"), repitiéndose el mismo fenómeno que en los compuestos fenólicos totales. Lo anterior no es de extrañarse, ya que al haber un bajo contenido de compuestos fenólicos totales, es lógica una baja capacidad antioxidante.

Por último, en los residuos de los lavados con cloroformo, solo se obtuvieron resultados de importancia en el agua de los lavados de la melanina; al igual que para los niveles de compuestos fenólicos totales. En este caso los valores oscilan entre 1.6-4.4 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca, y es muy posible que también se deban a las pequeñas moléculas de melanina separadas en el proceso de disolución y precipitación; las cuales fueron posteriormente arrastradas por el agua de los lavados. En cuanto al cloroformo de los lavados y el HCl 7 M para precipitar la solución alcalina de melanina, los resultados fueron poco importantes (0.008-0.2 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca).

Los altos valores de capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en melanina y los residuos de su extracción son de esperarse. Lo anterior ya que varios autores mencionan que en hongos patógenos de animales, o fitopatógenos como es el caso de nuestro objeto de estudio; las propiedades antioxidantes de la melanina actúan como un mecanismo de protección contra factores ambientales adversos (**Hamilton y Gomez, 2002; Jacobson, 2000; Shcherba y col., 2000; Henson y col., 1999; Butler y Day, 1998**).

En conclusión, todos los indicios y datos anteriormente mencionados, aportan más evidencia para hacer válida la hipótesis de que el huitlacoche es un alimento con propiedades nutracéuticas muy importantes.

9. 3. 2. Determinación de la Capacidad Antioxidante *in vitro* por el Método ORAC

9. 3. 2. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

Se determinó la capacidad antioxidante en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* por el método ORAC. A diferencia de TEAC-DPPH, en este método se generan artificialmente radicales peroxilo que reaccionan con fluoresceína. Conforme la reacción progresa, la fluoresceína es consumida y la fluorescencia decrece. En presencia de un antioxidante toma lugar una reacción competitiva entre la fluoresceína y el antioxidante, retardando el consumo de la fluoresceína. Así, la capacidad antioxidante puede ser calculada por la diferencia en el área bajo la curva entre el blanco y la muestra (**Jimenez-Alvarez y col., 2008**).

Para huitlacoche, los resultados obtenidos por este método fueron de 136.1, 82.7, 75 y 46.6 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca; en los extractos etanólico, acuoso frío, metanólico y acuoso caliente respectivamente. Mientras que para *Pleurotus ostreatus*, los resultados fueron de 109.4, 56.1, 41.1 y 38.4 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca; en los extractos acuoso frío, etanólico, acuoso caliente y metanólico respectivamente.

Como se puede observar, estos resultados son distintos a los obtenidos por TEAC-DPPH en algunos aspectos. En primer lugar, es muy notable que estos resultados son bastante superiores a los obtenidos por TEAC-DPPH; lo cual no es raro ya que este fenómeno ocurre muy a menudo, y se explica por el pobre desempeño del Trolox en este ensayo (**Tabart y col., 2009**). En segundo lugar, estos resultados no siguen una tendencia similar a los de TEAC-DPPH y por lo tanto a los de compuestos fenólicos totales. De forma más explícita, los extractos que obtuvieron los mayores y menores niveles en las dos pruebas antes mencionadas (TEAC-DPPH y compuestos fenólicos totales por Folin-Ciocalteu), no son los mismos que en ORAC. Esto ya había sido observado por **Szydłowska-Czerniak y col. (2010)** en su trabajo sobre semillas de colza; al encontrar una baja correlación de ORAC con compuestos fenólicos totales por Folin-Ciocalteu y de ORAC con TEAC-DPPH. **Tabart y col. (2009)** también observaron nula correlación y resultados muy diferentes, al aplicar TEAC-DPPH y ORAC en varios estándares de compuestos fenólicos. Por otro lado, también existen reportes donde se observa una correlación considerable entre ORAC y compuestos fenólicos totales; tal es el caso de **Dubost y col. (2007)** en su trabajo sobre hongos comestibles. Todas estas discrepancias pueden ser explicadas por

varias razones. Una de ellas es el mecanismo de reacción, ya que en este ensayo los radicales libres son generados a una tasa constante a lo largo de la prueba, combinando tanto tiempo de inhibición como grado de inhibición; resultando en una reacción completa. Lo anterior quiere decir que el método ORAC toma en cuenta la acción cinética de los antioxidantes, lo cual le da un significado diferente y no solo refleja el atrapamiento de radicales libres (**Szydłowska-Czerniak y col., 2010; Tabart y col., 2009**). Otra posible razón puede ser que el método ORAC mide la capacidad antioxidante de otros compuestos, así como también la de los compuestos fenólicos, lo cual no se observa en TEAC (**Zulueta y col., 2009**). Lo anterior puede sustentarse en que en TEAC-DPPH la accesibilidad estérica es el mayor determinante para la reacción; así, las moléculas pequeñas (compuestos fenólicos) tienen un mejor acceso al sitio del radical que las moléculas más grandes (compuestos con capacidad antioxidante no fenólicos) (**Prior y col., 2005**). Por último, otra posibilidad por la cual se presenten estas discrepancias es el uso del etanol; ya que se ha reportado que éste interfiere en la determinación de capacidad antioxidante por ORAC (**Tabart y col., 2009**). Esto se traslada a nuestro caso, en que los resultados que nos parecieron más extraños fueron los de los extractos etanólicos; pudiendo ser ésta la causa.

A pesar de las discrepancias antes mencionadas, el huitlacoche mantuvo los mayores niveles de capacidad antioxidante en todos los extractos, si se comparan con su contraparte en *Pleurotus ostreatus*. A excepción del extracto acuoso frío, donde *Pleurotus ostreatus* obtuvo un mayor nivel que huitlacoche con diferencias estadísticamente significativas. Esta situación pudo deberse al mayor contenido de compuestos fenólicos que existe en el extracto acuoso frío de *Pleurotus ostreatus* (7.9 mg EAG/g de muestra base seca), en comparación con el de huitlacoche (6.8 mg EAG/g de muestra base seca). Por otro lado, también pudo deberse a otro tipo de compuestos antioxidantes que no fueran fenólicos. Lo anterior ya que el rendimiento de extracción en el extracto acuoso frío de *Pleurotus ostreatus* (56.18%) fue muy superior al del huitlacoche (29.46%). Pudiendo arrastrar una mayor cantidad de compuestos no fenólicos con capacidad antioxidante.

Los niveles que obtuvimos de capacidad antioxidante por ORAC, se encuentran en los rangos de 46.6-136.1 y 38.4-109.4 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra base seca para huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* respectivamente. Los cuales son comparables a los obtenidos por **Dubost y col. (2007)** para otros hongos comestibles como champiñón, hongo café o

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Crimini, hongo Portobello (los tres *Agaricus bisporus*) y Shiitake o *Lentinula edodes* (80.0, 100.0, 131.33 y 55.67 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca); en comparación con Maitake o *Grifola frondosa* (33.67 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca) nuestros niveles son ligeramente superiores. En el trabajo citado anteriormente también se analizó *Pleurotus ostreatus*, presentando un nivel de 49.67 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca, el cual se encuentra dentro del rango obtenido por nosotros.

Existen varios reportes de alimentos que no son hongos, a los cuales se les ha determinado su capacidad antioxidante por el método ORAC. Algunos ejemplos de vegetales que muestran capacidades antioxidantes similares a las nuestras son zanahoria, col blanca, jitomate, ejote, cebolla blanca, pimiento morrón, coliflor, betabel, brócoli, ajo, col de Bruselas, alfalfa, berenjena y lechuga (60, 61, 67, 79, 85, 97, 102, 115, 126, 46, 70, 117, 80 y 49 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente; **Ou y col., 2002; Cao y col., 1996**). Algunos otros con capacidades antioxidantes inferiores son chícharo, maíz, papa, camote, calabaza amarilla, apio y pepino (19, 22, 15, 14, 17, 13 y 15 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente; **Ou y col., 2002; Cao y col., 1996**). Y otros con capacidades antioxidantes superiores son cebolla morada, espinaca y pimiento verde (143,152 y 154 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente; **Ou y col., 2002**). En comparación con algunas semillas, se tienen reportes de frijol pinto y negro (*Phaseolus vulgaris* L.) crudos que alcanzan niveles de 57.9 y 70.2 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente (**Xu y Chang, 2009**), los cuales son similares a los obtenidos por nosotros en ambos hongos. Otras como semilla de colza y frijol de soya Virginia, alcanzan rangos de 40920-129890 y 115.7-228.6 $\mu\text{mol ET/g}$ de semilla respectivamente (**Szydlowska-Czerniak y col., 2010; Chung y col., 2008**), siendo bastante superiores a nuestros niveles. También existen reportes en frutas donde se observa que la ciruela, naranja, uva roja, kiwi, toronja rosada, guayaba roja, guayaba blanca, pitahaya, lichi y papaya (cv. Red Lady) (79.1, 51.7, 36.0, 36.5, 48.3, 113.6, 76.74, 46.34, 36.24 y 49.53 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente; **Mahattanatawee y col., 2006; Wang y col., 1996**) presentan valores comparables a los nuestros. Otras como la uva blanca, banana, manzana, pera, melón, mamey, pitahaya blanca, mango, chicozapote y longan (*Dimocarpus longan*) (26.2, 9.0, 13.2, 9.6, 12.9, 18.59, 19.6, 12.86, 5.49 y 18.96 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente; **Mahattanatawee y col., 2006; Wang y col., 1996**) presentan valores inferiores. Por otro lado, también hay frutas que presentan valores superiores a los nuestros, como la carambola y la fresa con 150 y 153.6 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente (**Mahattanatawee y col., 2006; Wang**

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y col., 1996). En cuanto a algunas especias como perejil, orégano, canela, clavo, semilla de mostaza amarilla, pimienta negra y azafrán (653,1133, 2641, 1533, 287.59, 162.81 y 399.31 $\mu\text{mol ET/g}$ base seca respectivamente; Jimenez-Alvarez y col., 2008; Wu y col., 2004) nuestros resultados fueron bastante inferiores. Por último, en comparación con algunas bebidas como jugos de granada, uva Concord, arándano azul, cereza negra, acai, arándano rojo, naranja y manzana; así como vino rojo, té verde, té negro y té blanco (25.0, 25.9, 20.6, 25.3, 19.5, 15.4, 7.4, 4.8, 25.7, 5.3, 3.1 y 2.7 $\mu\text{mol ET/mL}$ respectivamente; Seeram y col., 2008) nuestros resultados fueron superiores.

Con todo lo anterior, se puede observar que la capacidad antioxidante por ORAC en huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* es importante, siendo en la mayoría de las ocasiones similar o superior a la de otros alimentos. Lo anterior aporta más evidencia de las propiedades nutraceuticas que poseen nuestros objetos de estudio.

9. 3. 2. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

Se determinó la capacidad antioxidante de la melanina extraída de huitlacoche así como de la sintética por el método ORAC. Para esta determinación la melanina se usó en forma de suspensión, teniendo como fase líquida la misma solución amortiguadora de fosfatos con la que se preparó el resto de los reactivos. Al igual que en el ensayo TEAC-DPPH para melanina, no fue recomendable disolver ésta en KOH. Lo anterior por que la prueba es sensible al pH y un cambio podría haber afectado la reacción (Zulueta y col., 2009).

Ya que la melanina no tuvo que disolverse, los resultados de capacidad antioxidante ($\mu\text{mol ET}$) fueron expresados de dos formas: por miligramo de melanina, y capacidad antioxidante procedente de melanina por gramo de muestra.

Los resultados obtenidos para capacidad antioxidante por miligramo de melanina ($\mu\text{mol ET/mg}$ de melanina) fueron de 1.9 para la sintética, y de 0.1 y 1.2 para la extracción 1 y 2 respectivamente. En cuanto a la capacidad antioxidante procedente de melanina en la muestra ($\mu\text{mol ET}$ procedente de melanina/g de muestra base seca), los resultados fueron de 1.3 para la extracción 1, y de 13.1 para la extracción 2.

Como se puede observar, en la melanina sintética el resultado fue superior al de ambas extracciones; fenómeno que ya había sido observado en el ensayo TEAC-DPPH para melanina. De igual forma, esto podría ser explicado por el proceso que implica la

extracción de melanina, ya que éste pudo afectar su capacidad antioxidante debido a los tratamientos químicos agresivos que conlleva.

En el caso de la capacidad antioxidante de la melanina extraída, se observa que la extracción 2 obtuvo mayores niveles que la extracción 1, lo cual ya había sido observado en el ensayo TEAC-DPPH para melanina. Sin embargo a diferencia de TEAC-DPPH, la diferencia entre ambas extracciones es muy amplia en este método. Es difícil explicar por qué ocurre este fenómeno, pero creemos que se debe a dos situaciones: pérdidas durante el proceso de extracción de melanina, y el mecanismo de reacción de la prueba.

En cuanto a las pérdidas durante el proceso de extracción de melanina, se sabe que en los residuos de la extracción existen compuestos fenólicos así como capacidad antioxidante (TEAC-DPPH). Lo cual posiblemente se deba a pequeños fragmentos de melanina de bajo peso molecular que no alcanzan a ser separados en el proceso de extracción. Como se pudo observar en secciones anteriores, los niveles más importantes en ambas extracciones se encuentran en el sobrenadante de la precipitación de la “melanina cruda”, en el agua de los lavados de la “melanina cruda” y en el agua de los lavados de melanina obtenida durante el proceso de purificación con cloroformo; lo que quiere decir que estas moléculas pueden ser movilizadas por el agua y no son lo suficientemente pesadas para alcanzar a precipitar. En general, ambas extracciones obtuvieron valores similares en todos los residuos (compuestos fenólicos y capacidad antioxidante por TEAC-DPPH). Sin embargo en el caso del agua de los lavados de la “melanina cruda”, y el agua de los lavados de melanina obtenida durante el proceso de purificación con cloroformo, la extracción 2 obtuvo valores menores que la extracción 1, que aunque fueron cercanos, presentan diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior a nuestro parecer, indica una menor pérdida de estos fragmentos de bajo peso molecular en la extracción 2 en comparación de la extracción 1. Así, la melanina de la extracción 1 es melanina de alto peso molecular con poca cantidad de fragmentos de bajo peso molecular que pueden ser fácilmente movilizadas por el agua; mientras que la melanina de la extracción 2 es también melanina de alto peso molecular, pero con una mayor cantidad de fragmentos de bajo peso molecular que pueden ser movilizadas por el agua. En teoría no es posible que la melanina sea solubilizada por el agua, sin embargo la estructura molecular de la melanina pudo ser dañada por el proceso de extracción, al grado de producir pequeños fragmentos que pueden movilizarse fácilmente en ella. Como

se mencionó anteriormente, existen protocolos donde se utiliza disolver, precipitar y lavar la melanina en varias ocasiones, con el fin eliminar moléculas de bajo peso molecular y obtener melanina más homogénea y de alto peso molecular, por lo tanto los argumentos anteriores no parecen tan extraños (**Wang y col., 2006; Goncalves y Pombeiro-Sponchiado, 2005**). En cuanto al mecanismo de reacción del ensayo, se sabe que se establece una reacción competitiva entre el antioxidante y la fluoresceína por el agente oxidante (**Jimenez-Alvarez y col., 2008**). En este contexto, la melanina de la extracción 2 al contener más fragmentos de bajo peso molecular que pueden movilizarse con mayor facilidad en el agua de la reacción (mediante agitación), compite de forma más efectiva con la fluoresceína por el agente oxidante. En cambio la melanina de la extracción 1, al contener menor cantidad de fragmentos de bajo peso molecular, no compite con la misma efectividad por el agente oxidante. Dado que la competencia entre ambas moléculas (antioxidante y fluoresceína) es determinante para la capacidad antioxidante por este método, se podrían explicar las amplias diferencias que se obtuvieron en su capacidad antioxidante.

En el caso de TEAC-DPPH no se observaron estas diferencias tan amplias, ya que esta prueba solo mide la inhibición de radicales libres y no toma en cuenta la cinética de los antioxidantes como en ORAC (**Szydłowska-Czerniak y col., 2010; Tabart y col., 2009**). Es decir, en TEAC-DPPH no existe competencia entre el antioxidante y una molécula sonda, mientras que en ORAC la competencia entre estas es determinante para la capacidad antioxidante.

Debido a que en la literatura no se encontraron trabajos similares, es difícil explicar los fenómenos antes mencionados así como comparar nuestros resultados. A pesar de esto, se logró determinar que existe capacidad antioxidante en la melanina de huitlacoche por el método ORAC. Lo cual aporta más indicios de las propiedades nutracéuticas de este alimento.

9. 3. 3. Medición de la Capacidad de los Extractos de Inducir Motilidad Intestinal

9. 3. 3. 1. Extractos de compuestos fenólicos solubles

Se determinó la capacidad de inducir motilidad intestinal en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*, al medir el efecto de estos sobre la tensión media de la contracción del intestino aislado de rata; el efecto general

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

observado fue un aumento en la tensión media de la contracción, lo que indica que se promueve la motilidad intestinal. En cuanto a huitlacoche, hubo poco efecto a concentraciones de 0.5 y 5.0 mg/mL en los cuatro extractos, mientras que a una concentración saturada de 50 mg/mL se mostró el mayor efecto, siendo estadísticamente significativo únicamente en los extractos etanólico y acuoso caliente; en general los mayores efectos fueron observados en los dos extractos antes mencionados. En el caso de *Pleurotus ostreatus* también se observó poco efecto a concentraciones de 0.5 y 5.0 mg/mL en los cuatro extractos, mientras que a una concentración saturada de 50 mg/mL se observó el mayor efecto, siendo estadísticamente significativo en los extractos metanólico, acuoso frío y acuoso caliente; en general los mayores efectos fueron observados en los extractos acuosos frío y caliente.

Por otro lado, también se realizó el experimento utilizando el neurotransmisor acetilcolina (ACh), lo anterior con la finalidad de comparar el efecto producido por éste con el de nuestros extractos. De antemano se sabe que el neurotransmisor interviene en la contracción muscular al unirse a los receptores de ACh (nicotínicos y muscarínicos) de las fibras musculares (www.biopsicologia.net/fichas/page_86.html). En el caso de músculo liso del intestino, se sabe que los receptores encontrados son los muscarínicos del subtipo M3, los cuales al ser activados comienzan una cascada de señalización con proteína G, que culmina con la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático y, consecuentemente causa la contracción del músculo (**Eglen y col., 1994**); de esta manera el efecto encontrado fue un aumento en la tensión media de la contracción (tensión) del intestino aislado de rata. En comparación con los extractos de ambos hongos, se observó que a concentraciones de 0.5 y 5 mg/mL los efectos son muy inferiores a los producidos por ACh, siendo estadísticamente iguales a la tensión basal. Sin embargo a una concentración saturada de 50 mg/mL, los extractos de ambos hongos tienen efectos similares a la ACh, siendo el efecto del extracto acuoso caliente de *Pleurotus ostreatus* estadísticamente igual que el mostrado por ACh; en general los efectos más parecidos al mostrado por ACh fueron los de los extractos acuoso frío y caliente de *Pleurotus ostreatus*.

Con anterioridad ya han sido estudiados los efectos de *Pleurotus ostreatus* y huitlacoche así como de otros hongos sobre la contracción muscular, encontrándose diversos

resultados (Juntas y col., 2009; Žužek y col., 2006; Schacter y col., 2005; Gage y col., 2002).

En cuanto a huitlacoche se encontró que la cepa P4 de *Ustilago maydis* bloquea específicamente los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje en mamíferos, este tipo de canales de Ca^{2+} se encuentran principalmente en musculo y células cardiacas y su bloqueo inhibe la contracción muscular. El bloqueo de estos canales es producido por una toxina denominada KP4, la cual es un polipéptido de 105 aminoácidos producida por el virus UMV4 que infecta a la cepa P4 de *Ustilago maydis*, ésta se une competitivamente con el Ca^{2+} a la porción exterior del canal (Gage y col., 2002). En nuestros experimentos sobre intestino aislado de rata no se muestran tales efectos, ya que por el contrario se promueve la motilidad intestinal al aumentar la tensión media de la contracción; aunque el efecto no es tan grande como en el caso de los extractos de *Pleurotus ostreatus*, los efectos de los extractos etanólico y acuoso caliente (saturados a 50 mg/mL) de huitlacoche son estadísticamente significativos. La causa más probable de que no exista una inhibición en la contracción, es que el material utilizado no se encontraba infectado por el virus UMV4, por lo tanto la toxina antes mencionada no era secretada por nuestro material. Por el contrario, el aumento en la tensión media de la contracción pudo ser causada por algunos compuestos aun no identificados que estimularon a las células del musculo liso del intestino a contraerse; algunos de los compuestos que posiblemente producen esta estimulación son fibras solubles y polisacáridos, ya que como se ha mencionado, el huitlacoche posee altas cantidades de carbohidratos y fibra (Valverde y col., 1995). También es posible que el hongo contenga otras moléculas que actúen directamente sobre los receptores que promueven el movimiento del intestino. Los efectos mostrados por huitlacoche son importantes, ya que su consumo podría evitar ciertos trastornos digestivos como el estreñimiento, además de que junto con la capacidad antioxidante mostrada, podría prevenir algunas patologías como cáncer de colon. No obstante, se necesitan más estudios así como la identificación de las moléculas que producen estos efectos en la motilidad intestinal para poder afirmarlo. A pesar de todo, las evidencias encontradas en estos experimentos nos demuestran las propiedades nutraceuticas del huitlacoche.

En el caso de *Pleurotus ostreatus* también se han realizado varios estudios acerca de sus efectos sobre la contracción muscular. En 2005 Schacter y col. encontraron que el

extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* causa constricción en relación a la dosis del músculo liso aislado de vías respiratorias de cerdo de Guinea; este efecto fue causado por mecanismos no inmunológicos involucrando una variedad de mediadores de las vías respiratorias y posiblemente receptores colinérgicos. En este estudio el pretratamiento con atropina (antagonista competitivo del receptor muscarínico de ACh) redujo los efectos contráctiles del extracto, sugiriendo una interacción de éste con receptores muscarínicos. También el TMB-8 [ácido 3, 4, 5-trimetoxibenzoico 8-(dietilamina) octil éster], un inhibidor de la movilización de Ca^{2+} intracelular, bloqueo el efecto constrictor del extracto, indicando el papel de la movilización del Ca^{2+} en el efecto constrictor del extracto. Por otro lado, se ha reportado que *Pleurotus ostreatus* produce una proteína llamada ostreolisina (Oly), la cual tiene un peso molecular de 15 KDa y se le atribuyen propiedades tóxicas. Se habla de que han ocurrido intoxicaciones locales esporádicas en humanos y animales después de la ingesta de altas cantidades de hongos frescos, por lo cual se ha sugerido que la toxicidad está asociada con la molécula(s) proteica(s) termolábil (**Juntes y col., 2009; Žužek y col., 2006**). En **2009 Juntes y col.** probaron el efecto de Oly sobre anillos arteriales coronarios porcinos *in vitro*, encontrando que ésta causa vasoconstricción dependiente de la dosis y previene la relajación mediada por el endotelio. En este estudio se usaron pretratamientos con verapamilo (bloqueador de los canales de Ca^{2+} tipo L) y cloruro de lantano (bloqueador de canales de cationes no específico), encontrando que en el caso del verapamilo se redujeron enormemente las contracciones provocadas por Oly, mientras que el lantano las eliminó por completo. Lo anterior proporciona evidencia de que las contracciones de las arterias coronarias inducidas por Oly, son debidas principalmente a la mayor entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L y a canales de cationes no selectivos. En nuestro estudio sobre intestino aislado de rata, los extractos de *Pleurotus ostreatus* mostraron efectos superiores que los de huitlacoche, lo cual posiblemente indique que Oly también actúa sobre células de músculo liso del intestino; sin embargo esto no puede ser confirmado ya que nosotros usamos los extractos crudos sin aislar la proteína. Por otra parte, los mayores efectos mostrados por *Pleurotus ostreatus* fueron los del extracto acuoso caliente y posteriormente los del extracto acuoso frío, lo cual no concuerda con los antecedentes antes mencionados ya que se dice que Oly es una proteína termolábil. Posiblemente el fenómeno anterior se deba a que el calentamiento aplicado en la extracción no fue el necesario para eliminar a Oly, y a que gracias a éste se extrajeron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

más moléculas que promueven la motilidad intestinal como fibra soluble y polisacáridos, observándose los resultados antes mencionados. A pesar de los hallazgos encontrados por nosotros, se necesitan más estudios para poder confirmar que la inducción de motilidad en intestino aislado de rata es causada por Oly. Sin embargo ahora sabemos que *Pleurotus ostreatus* promueve la motilidad intestinal (independientemente del mecanismo), lo cual es importante ya que como en el caso de huitlacoche su consumo podría evitar trastornos y patologías digestivas. Lo anterior aporta evidencia de las propiedades nutraceuticas de *Pleurotus ostreatus*.

Existen otros hongos (comestibles y no comestibles) los cuales han mostrado tener efectos sobre la contracción muscular. Un ejemplo de ellos son los hongos del genero *Aspergillus* sp., el cual produce un metabolito secundario denominado WIN 64821 que actúa como un antagonista competitivo de la sustancia P (SP), en experimentos sobre la contractilidad de íleon de cerdo de Guinea. SP pertenece a una familia de neuropéptidos llamada taquicininas, las cuales tienen diversas acciones farmacológicas sobre varios sistemas del organismo incluyendo el gastrointestinal; de esta manera, WIN 64821 al actuar como antagonista competitivo de SP, bloquea su acción sobre el intestino inhibiendo las contracciones inducidas por SP (**Oleynek y col., 1994**). Por otro lado el hongo *Albatrellus confluens* produce un compuesto llamado albaconol, el cual induce contracción en tráquea de cerdo de Guinea *in vitro* al actuar como agonista del receptor VR. El receptor VR está involucrado en la transmisión y modulación del dolor en el sistema nervioso central y periférico, no obstante su expresión no está limitada a tejidos neuronales, también existe expresión en muchas otras células entre las que se encuentran las de musculo liso. A su activación se produce un rápido incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular con la consecuente contracción del musculo (**Cortright y Szallasi, 2004; Yang y col., 2003**). Un último ejemplo es una lectina aislada de micelio del hongo comestible *Tricholoma mongolicum*, la cual presenta acción hipotensora mediada por vasorelajación vía receptores de adenosina A_2 y/o producción de oxido nítrico (**Wang y col., 1996**).

Como se pudo observar anteriormente, existen bastantes hongos que poseen efectos sobre la contracción muscular (inhibición o inducción) en diferentes órganos, sin que nuestros objetos de estudio sean la excepción. No obstante, en nuestros objetos de estudio se requiere más investigación para determinar los mecanismos por los cuales se

originan sus efectos, ya que de esta manera se podrían desarrollar productos benéficos desde el punto de vista farmacológico y de investigación. Hasta los experimentos realizados, podemos decir que los efectos sobre la motilidad intestinal mostrados por huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* son importantes y benéficos, ya que pueden ayudar en la prevención y tratamiento de trastornos gastrointestinales.

9. 3. 3. 2. Extractos de compuestos fenólicos insolubles

La melanina (extraída y sintética) no mostró ningún efecto sobre la motilidad del intestino de rata aislado. La causa más probable de la ausencia de efecto, fue que la melanina no se encontraba disuelta sino en suspensión. La disolución de la melanina para el experimento fue imposible, ya que el único solvente donde puede disolverse (KOH 2M) hubiera provocado efectos no deseados, enmascarando los posibles efectos de la melanina.

10. CONCLUSIONES

- Se logró la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos solubles a partir de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*.
- Se logró la obtención de extractos de compuestos fenólicos insolubles (melanina) a partir de huitlacoche.
- Se logró la cuantificación de compuestos fenólicos totales mediante el reactivo Folin-Ciocalteu en los extractos de compuestos fenólicos solubles e insolubles (melanina).
- La cantidad de compuestos fenólicos solubles es considerable en los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*, siendo mayor en los extractos acuosos fríos de ambos hongos.
- La cantidad de compuestos fenólicos en la melanina extraída de huitlacoche es alta, siendo superior al 74% de la melanina extraída. En cuanto a los compuestos fenólicos procedentes de melanina en la muestra la cantidad también es alta, siendo incluso superior a las mostradas por los extractos de compuestos fenólicos solubles (extracto etanólico, metanólico, acuoso frío y acuoso caliente) de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*.
- Los extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* así como la melanina extraída de huitlacoche poseen capacidad antioxidante, comprobándose mediante dos metodologías que se basan en reacciones distintas (TEAC-DPPH y ORAC).
- Se determinó una mayor capacidad antioxidante en la mayoría de los extractos de compuestos fenólicos solubles (extracto etanólico, metanólico, acuoso frío y acuoso caliente) de huitlacoche en comparación con los de *Pleurotus ostreatus*. Por otro lado, los mayores niveles de capacidad antioxidante fueron observados en los extractos acuosos fríos de ambos hongos.
- En TEAC-DPPH, la capacidad antioxidante procedente de melanina en la muestra es alta, siendo incluso superior a las mostradas por todos los extractos de compuestos fenólicos solubles (extracto etanólico, metanólico, acuoso frío y

acuoso caliente) de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*. En ORAC los resultados fueron muy variables, no obstante se determinó que la melanina posee capacidad antioxidante por este método.

- Se logró cuantificar compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en los residuos de la extracción de la melanina, obteniéndose resultados muy altos en algunos residuos. Se cree que estos resultados son ocasionados por moléculas de melanina de bajo peso molecular, sugiriendo grandes pérdidas durante el proceso de extracción.
- Los extractos de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* tienen efectos sobre la motilidad del intestino delgado de rata, sobre todo en la tensión media de la contracción. Los mayores efectos fueron mostrados a una concentración saturada de 50 mg/mL, principalmente en el etanólico y acuoso caliente de huitlacoche, y en el acuosos caliente y frío de *Pleurotus ostreatus*. El extracto acuoso caliente de *Pleurotus ostreatus* mostro efectos estadísticamente iguales que el neurotransmisor acetilcolina (1×10^{-6} M).
- La melanina extraída de huitlacoche no mostró efectos sobre la motilidad del intestino delgado de rata al usarse en forma de suspensión.
- La presencia de compuestos fenólicos en todos los extractos, la actividad antioxidante, y los efectos sobre la motilidad del intestino de rata, sugieren que el huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* poseen propiedades nutracéuticas importantes.

11. APÉNDICE

11. 1. Análisis Estadístico del Rendimiento de Extracción en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*

FV	GL	SC	CM	F	P
Factor A (hongo)	1	454.669922	454.669922	224.7424	0.000
Factor B (tipo de extracto)	3	3341.361328	1113.787109	550.5427	0.000
Interacción	3	704.181641	234.727219	116.0252	0.000
Error	16	32.369141	2.023071		
Total	23	4532.582031			

C. V. = 5.30%

11. 2. Curvas de Calibración y Análisis Estadístico en la Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Totales

11. 2. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

11. 2. 1. 1. Curvas de calibración

Para el cálculo de los fenoles totales en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*, se realizaron tres curvas de calibración de ácido gálico disuelto en los tres diferentes agentes de extracción usados para preparar los extractos, las curvas se muestran a continuación:

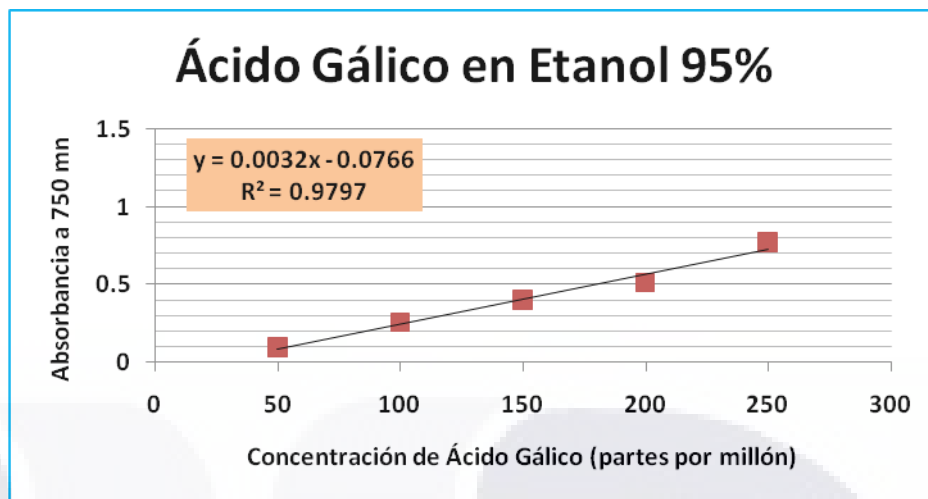


Figura 32. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia a 750 nm vs. ácido gálico disuelto en etanol al 95%. Ésta fue utilizada para calcular el contenido de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos de huitlacoche y *P. ostreatus*.

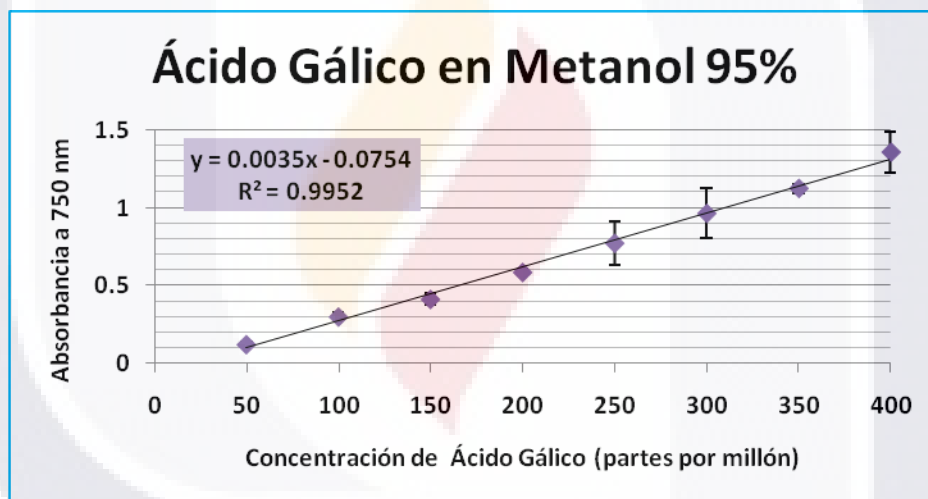


Figura 33. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia a 750 nm vs. ácido gálico disuelto en metanol al 95%. Ésta fue utilizada para calcular el contenido de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de huitlacoche y *P. ostreatus*.

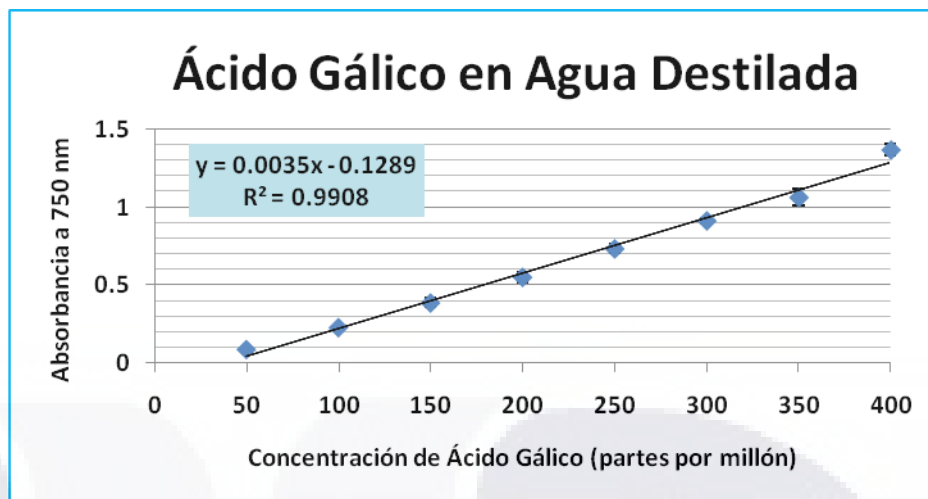


Figura 34. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia a 750 nm vs. ácido gálico disuelto en agua destilada. Ésta fue utilizada para calcular el contenido de compuestos fenólicos en los extractos acuosos fríos y calientes de huitlacoche y *P. ostreatus*.

11. 2. 1. 2. Análisis estadístico

Tabla 24. Análisis de Varianza de Compuestos Fenólicos Totales en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*

FV	GL	SC	CM	F	P
Factor A (hongo)	1	1.306671	1.306661	23.5793	0.000
Factor B (tipo de extracto)	3	68.390015	22.796671	411.3727	0.000
Interacción	3	7.570038	2.523346	45.5345	0.000
Error	16	0.886658	0.055416		
Total	23	78.153381			

C. V. = 5.19%

11. 2. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

11. 2. 2. 1. Curvas de calibración

Para el cálculo de compuestos fenólicos totales en melanina extraída de huitlacoche y en los residuos de la extracción de melanina, se realizaron 2 curvas de calibración de ácido gálico disuelto en KOH 2 M, lo anterior debido a que las determinaciones de la melanina y los residuos se hicieron en tiempos distintos, las curvas se muestran a continuación:

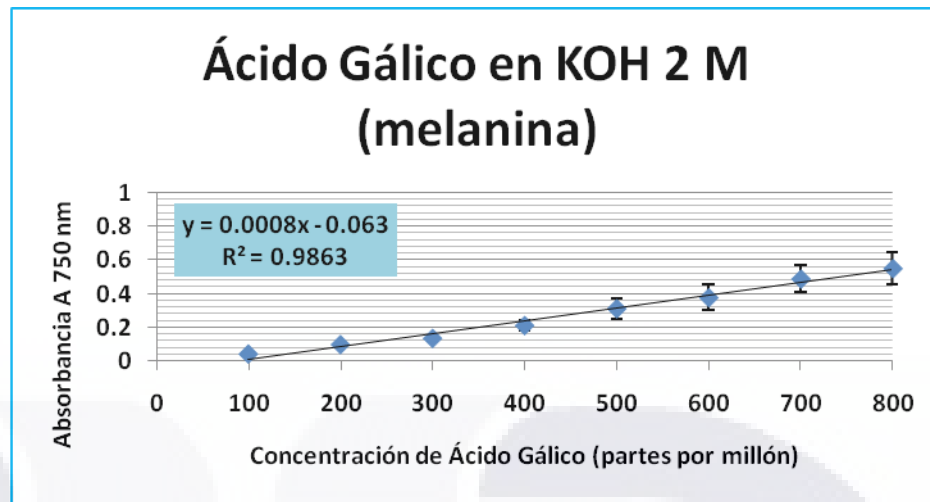


Figura 35. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia a 750 nm vs. ácido gálico disuelto en KOH 2 M. Ésta fue utilizada para calcular el contenido de compuestos fenólicos en la melanina extraída de huitlacoche y en la melanina sintética.

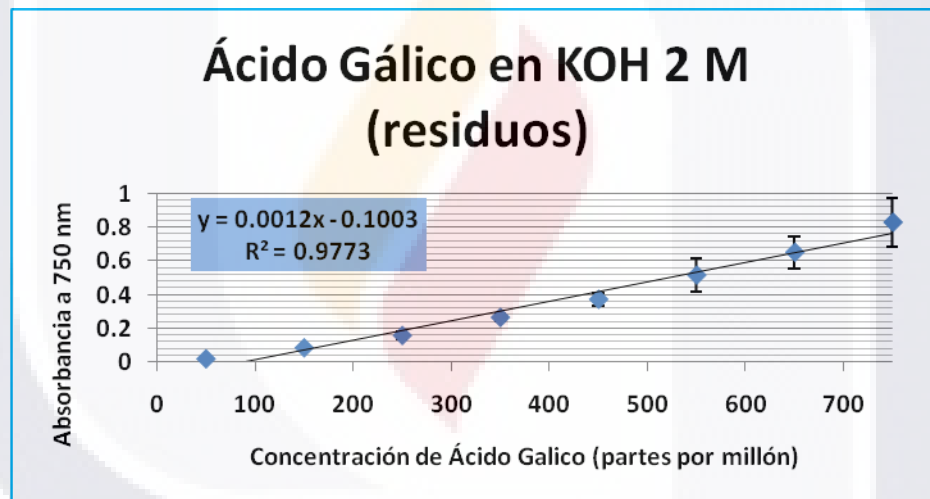


Figura 36. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia a 750 nm vs. ácido gálico disuelto en KOH 2 M. Ésta fue utilizada para calcular el contenido de compuestos fenólicos en los residuos de la extracción de melanina de huitlacoche.

11. 2. 2. 2. Análisis estadístico

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (melanina)	2	0.012863	0.006432	2.5103	0.161
Error	6	0.015372	0.002562		
Total	8	0.028235			

C. V. = 5.31%

Tabla 26. Prueba T-pareada para Compuestos Fenólicos Totales por Miligramo de Melanina Extraída

Ho: Las poblaciones tienen la misma media (Ho: $M1 = M2$), no hay diferencia significativa entre los tratamientos.
 Vs
 Ha: Las poblaciones tienen diferente media (Ha: $M1 \neq M2$), los tratamientos son diferentes.

	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar de la Media	Valor P 0.044
Extracción 1	3	0.7427	0.0079	0.0045	
Extracción 2	3	0.9188	0.0739	0.0427	
Diferencia	3	-0.1760	0.0660	0.0381	

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis Ho: $M1 = M2$, y se concluye que hay una diferencia significativa entre las medias de las poblaciones.

Tabla 27. Prueba T-pareada para Compuestos Fenólicos Totales Procedentes de Melanina en la Muestra

Ho: Las poblaciones tienen la misma media (Ho: $M1 = M2$), no hay diferencia significativa entre los tratamientos.
 Vs
 Ha: Las poblaciones tienen diferente media (Ha: $M1 \neq M2$), los tratamientos son diferentes.

	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar de la Media	Valor P 0.260
Extracción 1	3	9.070	0.096	0.055	
Extracción 2	3	9.682	0.779	0.450	
Diferencia	3	-0.613	0.683	0.394	

Por lo tanto, no se rechaza la hipótesis Ho: $M1 = M2$.

Tabla 28. Análisis de Varianza de Compuestos Fenólicos Totales en Residuos de la Extracción de Melanina

FV	GL	SC	CM	F	P
Factor A (extracción)	1	1.959839	1.959839	9.4622	0.004
Factor B (residuo)	7	4964.063477	709.151917	3423.8235	0.000
Interacción	7	13.078857	1.868408	9.0208	0.000
Error	32	6.627930	0.207123		
Total	47	4985.730103			

C. V. = 7.00%

11. 3. Curvas de Calibración y Análisis Estadístico en la Medición de Capacidad Antioxidante por el Método TEAC-DPPH

11. 3. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

11. 3. 1. 1. Curvas de calibración

Para el cálculo de capacidad antioxidante por TEAC-DPPC en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*, se realizaron tres curvas de calibración de absorbancia de DPPH (515 nm) vs. Trolox, éste se encontraba disuelto en los tres diferentes agentes de extracción usados para preparar los extractos. Las curvas se muestran a continuación:

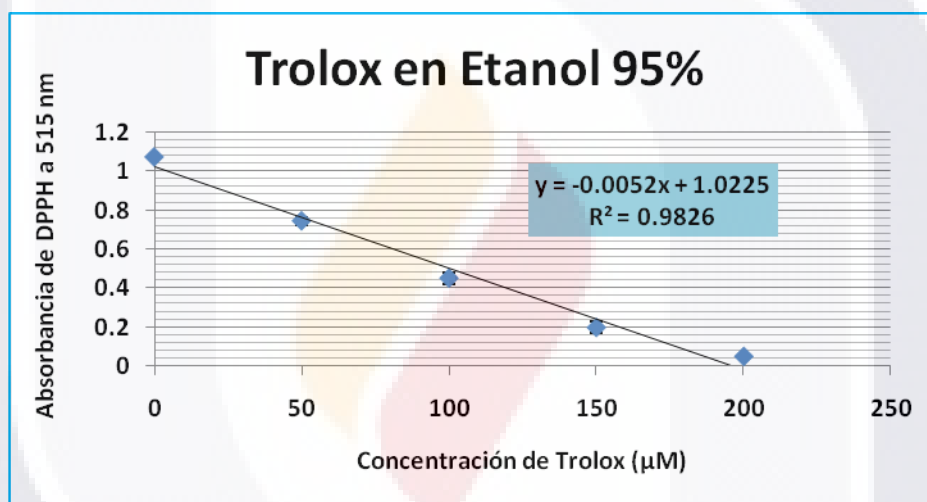


Figura 37. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia de DPPH vs. Trolox disuelto en etanol al 95%. Esta curva fue utilizada para calcular la capacidad antioxidante en los extractos etanólicos de huitlacoche y *P. ostreatus*.

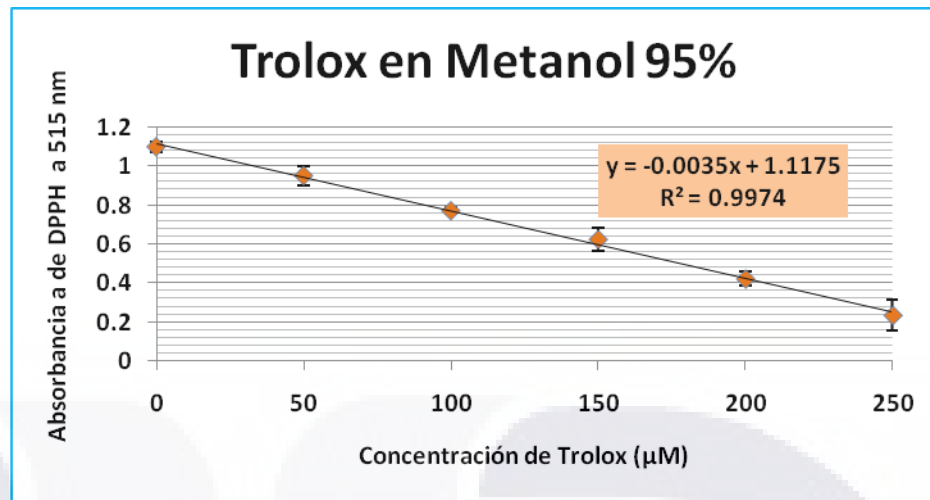


Figura 38. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia de DPPH vs. Trolox disuelto en metanol al 95%. Esta curva fue utilizada para calcular la capacidad antioxidante en los extractos metanólicos de huitlacoche y *P. ostreatus*.

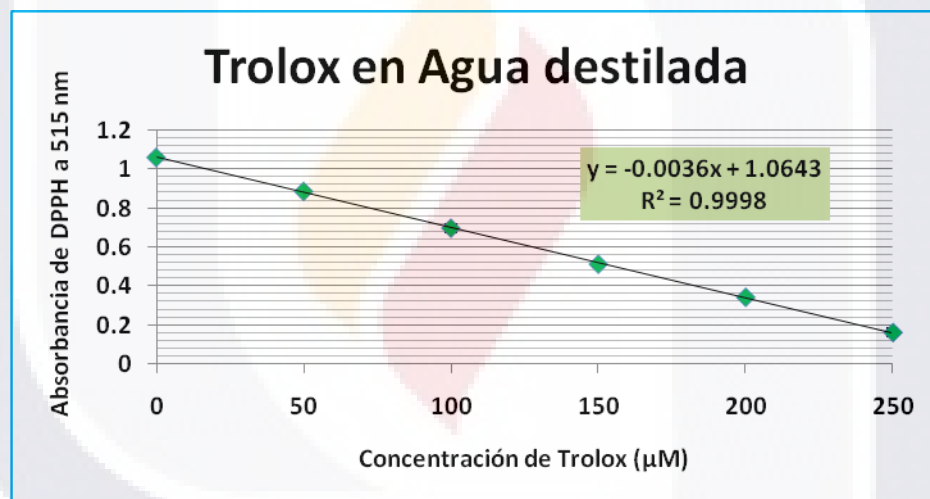


Figura 39. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia de DPPH vs. Trolox disuelto en agua destilada. Esta curva fue utilizada para calcular la capacidad antioxidante en los extractos acuoso fríos y calientes de huitlacoche y *P. ostreatus*.

11. 3. 1. 2. Análisis estadístico

FV	GL	SC	CM	F	P
Factor A (hongo)	1	39.783737	39.783737	1239.9689	0.000
Factor B (tipo de extracto)	3	51.071228	17.023743	530.5914	0.000
Interacción	3	18.141266	6.047089	188.4740	0.000
Error	16	0.513351	0.032084		
Total	23	109.509583			

C. V. = 7.48%

11. 3. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

11. 3. 2. 1. Curvas de calibración

Para el cálculo de capacidad antioxidante por TEAC-DPPH en melanina extraída de huitlacoche y en los residuos de la extracción de melanina, se realizaron dos curvas de calibración de absorbancia de DPPH (515 nm) vs. Trolox disuelto en metanol absoluto, lo anterior debido a que las determinaciones de la melanina y los residuos se hicieron en tiempos distintos, las curvas se muestran a continuación:

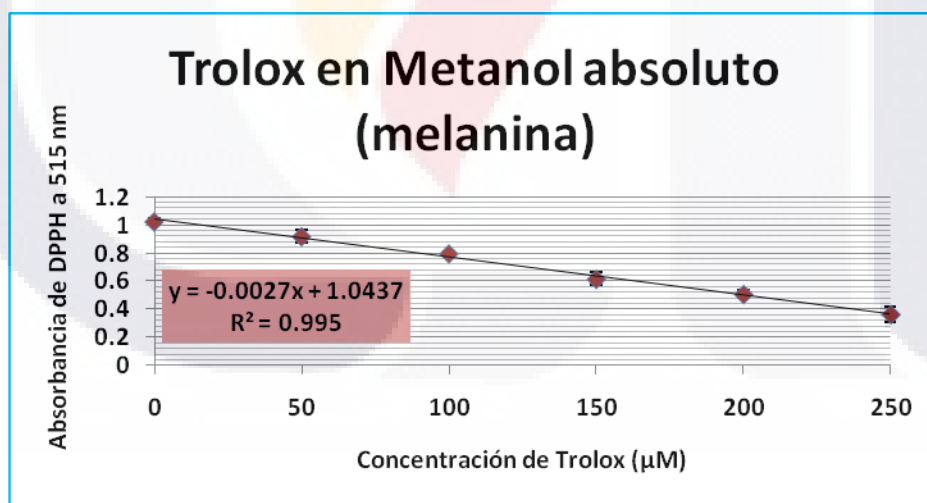


Figura 40. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia de DPPH vs. Trolox disuelto en metanol absoluto. Esta curva fue utilizada para calcular la capacidad antioxidante en la melanina extraída de huitlacoche y en la melanina sintética.

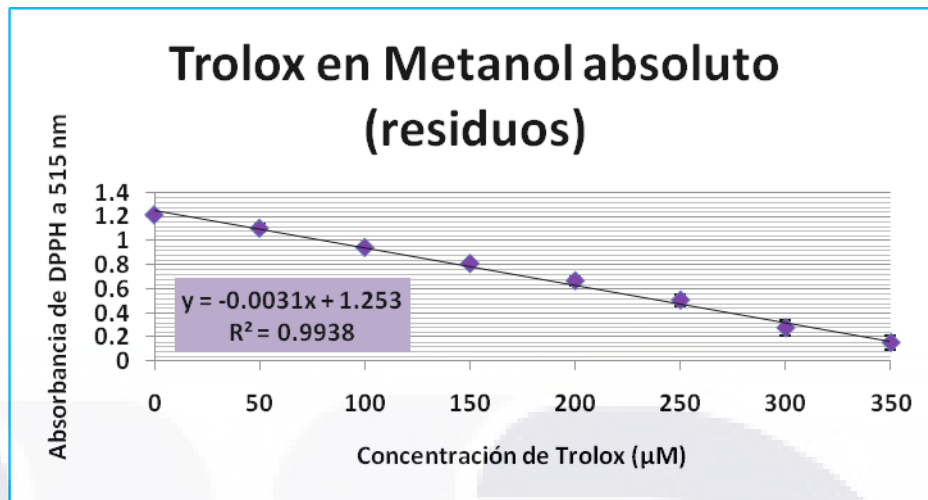


Figura 41. En la ilustración se muestra la curva de calibración de absorbancia de DPPH vs. Trolox disuelto en metanol absoluto. Esta curva fue utilizada para calcular la capacidad antioxidante en los residuos de la extracción de melanina.

11. 3. 2. 2. Análisis estadístico

Tabla 30. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante TEAC-DPPH por Miligramo de Melanina

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (melanina)	2	1.608889	0.804444	80.4413	0.000
Error	6	0.060002	0.01		
Total	8	1.668891			

C. V. = 10.11%

Tabla 31. Prueba T-pareada para Capacidad Antioxidante TEAC-DPPH Procedente de Melanina en la Muestra

Ho: Las poblaciones tienen la misma media (Ho: M1 = M2), no hay diferencia significativa entre los tratamientos.
Vs
Ha: Las poblaciones tienen diferente media (Ha: M1 <> M2), los tratamientos son diferentes.

	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar de la Media	Valor P
Extracción 1	3	7.27	1.85	1.07	0.172
Extracción 2	3	8.80	0.96	0.56	
Diferencia	3	-1.533	1.27	0.733	

Por lo tanto, no se rechaza la hipótesis Ho: M1 = M2.

Tabla 32. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante TEAC-DPPH en Residuos de la Extracción de Melanina					
FV	GL	SC	CM	F	P
Factor A (extracción)	1	1.019165	1.019165	4.6371	0.037
Factor B (residuo)	7	1388.073242	198.296173	902.2330	0.000
Interacción	7	12.051086	1.721584	7.8331	0.000
Error	32	7.033081	0.219784		
Total	47	1408.176575			

C. V. = 12.96%

11. 4. Curvas de Calibración y Análisis Estadístico en la Medición de Capacidad Antioxidante por el Método ORAC

11. 4. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

11. 4. 1. 1. Curvas de calibración

Para el cálculo de capacidad antioxidante por ORAC en los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus*, se realizó una curva de calibración teniendo como agente antioxidante el Trolox. Es necesario mencionar que la misma curva de calibración también fue usada para el cálculo de capacidad antioxidante en la melanina extraída de huitlacoche. La curva se muestra a continuación:

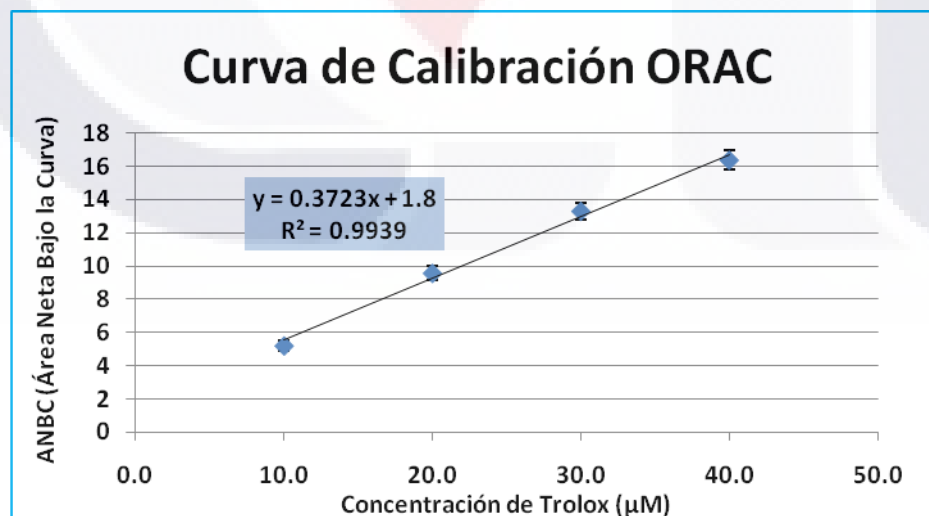


Figura 42. En la ilustración se muestra la curva de calibración de Trolox disuelto en solución amortiguadora de fosfatos vs. ANBC (Área Neta Bajo la Curva). Ésta fue utilizada para calcular la capacidad antioxidante en los extractos de compuestos fenólicos solubles obtenidos de huitlacoche y *P. ostreatus*, así como en la melanina extraída de huitlacoche y melanina sintética.

11. 4. 1. 2. Análisis estadístico

Tabla 33. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante ORAC en Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles de Huitlacoche y <i>Pleurotus ostreatus</i>					
FV	GL	SC	CM	F	P
Factor A (hongo)	1	2282.445313	2282.445313	22.9901	0.002
Factor B (tipo de extracto)	3	8682.382813	2894.127686	29.1514	0.000
Interacción	3	6198.843750	2066.281250	20.8128	0.001
Error	8	794.234375	99.279297		
Total	15	17957.906250			
C. V. = 13.62%					

11. 4. 2. Extractos de Compuestos Fenólicos Insolubles

11. 4. 2. 1. Curvas de calibración

Para el cálculo de capacidad antioxidante por ORAC en la melanina extraída de huitlacoche, se utilizó la misma curva de calibración que para los extractos de compuestos fenólicos solubles de huitlacoche y *Pleurotus ostreatus* (Figura 42).

11. 4. 2. 2. Análisis estadístico

Tabla 34. Análisis de Varianza de Capacidad Antioxidante ORAC por Miligramo de Melanina					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (melanina)	2	5.027588	2.513794	127.6117	0.000
Error	6	0.118193	0.019699		
Total	8	5.145781			
C. V. = 12.88%					

Tabla 35. Prueba T-pareada para Capacidad Antioxidante ORAC Procedente de Melanina en la Muestra					
Ho: Las poblaciones tienen la misma media (Ho: $M1 = M2$), no hay diferencia significativa entre los tratamientos.					
Vs					
Ha: Las poblaciones tienen diferente media (Ha: $M1 \neq M2$), los tratamientos son diferentes.					
	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar de la Media	Valor P 0.001
Extracción 1	3	1.309	0.110	0.064	
Extracción 2	3	13.115	0.775	0.447	
Diferencia	3	-11.805	0.666	0.384	
Por lo tanto, se rechaza la hipótesis Ho: $M1 = M2$, y se concluye que hay una diferencia altamente significativa entre las medias de las poblaciones.					

11. 5. Análisis Estadístico de la Inducción de Motilidad Intestinal

11. 5. 1. Extractos de Compuestos Fenólicos Solubles

11. 5. 1. 1. Extractos de huitlacoche

Tabla 36. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Etanólico de Huitlacoche					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	1.768433	0.589478	7.5133	0.005
Error	12	0.941498	0.078458		
Total	15	2.709930			
C. V. = 11.83%					

Tabla 37. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Metanólico de Huitlacoche					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	2.244057	0.748019	1.9359	0.177
Error	12	4.636742	0.386395		
Total	15	6.880798			
C. V. = 28.90%					

Tabla 38. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Frío de Huitlacoche					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	1.310898	0.436966	2.8405	0.082
Error	12	1.846031	0.153836		
Total	15	3.156929			
C. V. = 16.63%					

Tabla 39. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Caliente de Huitlacoche					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	1.551674	0.517225	8.1010	0.004
Error	12	0.766167	0.063847		
Total	15	2.317841			
C. V. = 10.68%					

11. 5. 1. 2. Extractos de *Pleurotus ostreatus*

Tabla 40. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Etanólico de <i>Pleurotus ostreatus</i>					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	0.623909	0.207970	2.6551	0.095
Error	12	0.939941	0.078328		
Total	15	1.563850			
C. V. = 11.96%					

Tabla 41. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Metanólico de <i>Pleurotus ostreatus</i>					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	0.262909	0.087636	3.9686	0.035
Error	12	0.264992	0.022083		
Total	15	0.527901			
C. V. = 7.08%					

Tabla 42. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Frío de <i>Pleurotus ostreatus</i>					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	2.749664	0.916555	18.3952	0.000
Error	12	0.597908	0.049826		
Total	15	3.347572			
C. V. = 9.43%					

Tabla 43. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo del Extracto Acuoso Caliente de <i>Pleurotus ostreatus</i>					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (concentración del extracto)	3	3.427994	1.142665	12.1494	0.001
Error	12	1.128609	0.094051		
Total	15	4.556602			
C. V. = 12.00%					

11. 5. 2. Acetilcolina

Tabla 44. Prueba T-pareada para Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de Acetilcolina (1×10^{-6} M)					
Ho: Las poblaciones tienen la misma media (Ho: $M1 = M2$), no hay diferencia significativa entre los tratamientos.					
Vs					
Ha: Las poblaciones tienen diferente media (Ha: $M1 \neq M2$), los tratamientos son diferentes.					
	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar de la Media	Valor P 0.006
Tensión basal (sin estímulo)	4	2.083	0.088	0.044	
ACh 1×10^{-6} M	4	3.540	0.461	0.230	
Diferencia	4	-1.457	0.425	0.212	
Por lo tanto, se rechaza la hipótesis Ho: $M1 = M2$, y se concluye que hay una diferencia altamente significativa entre las medias de las poblaciones.					

11. 5. 3. Comparación Entre el Efecto del Extracto, Acetilcolina y Tensión Basal

Tabla 45. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de los Extractos de Ambos Hongos (0.5 mg/mL), Acetilcolina y Tensión Basal					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (estímulo)	9	7.294083	0.810454	9.7604	0.000
Error	30	2.491043	0.083035		
Total	39	9.785126			
C. V. = 12.56%					

Tabla 46. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de los Extractos de Ambos Hongos (5.0 mg/mL), Acetilcolina y Tensión Basal					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (estímulo)	9	6.796494	0.755166	7.2012	0.000
Error	30	3.145981	0.104866		
Total	39	9.942474			
C. V. = 13.69%					

Tabla 47. Análisis de Varianza de la Tensión Media de la Contracción Bajo Estímulo de los Extractos de Ambos Hongos (50.0 mg/mL), Acetilcolina y Tensión Basal					
FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos (estímulo)	9	6.743683	0.749298	3.8090	0.003
Error	30	5.901489	0.196716		
Total	39	12.645172			
C. V. = 15.61%					

12. GLOSARIO

Acetilcolina: Éster de ácido acético y colina con fórmula química $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Adyuvante: Que ayuda. En el caso de tratamientos médicos, se dice que un tratamiento es adyuvante cuando acompaña (posteriormente) a un tratamiento previo considerado principal.

Agalla: Estructura de tipo tumoral inducida por insectos y otros artrópodos, nemátodos, hongos o bacterias. Se trata de la respuesta del vegetal a la presencia del parásito con un crecimiento anómalo de tejido que intenta aislar el ataque o infección.

Agonista: Sustancia que es capaz de unirse a un receptor y provocar una respuesta en la célula.

Antagonista: Sustancia que es capaz de unirse a un receptor sin provocar una respuesta biológica, pero bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas.

Antagonista Competitivo: Antagonista que se une a un receptor celular sin activarlo. El antagonista competirá contra cualquier agonista por los sitios de unión del receptor. Una cantidad suficiente de sustancia antagonista desplazará a la sustancia agonista de los sitios de unión, como resultado habrá una baja en la frecuencia de la activación del receptor.

Antiespasmódicos: Sustancias o fármacos que ayudan a disminuir o detener los espasmos musculares.

Antimutagénicos: Sustancias que reducen o interfieren con los efectos mutagénicos de otra sustancia.

Antioxidante: Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Antiproliferativas: Relativo a antiproliferativo, que es una sustancia que impide la reproducción celular, comúnmente se refiere a sustancias que previenen la reproducción de células cancerosas, aunque pueden actuar sobre células normales.

Antirradical: Característica de contrarrestar radicales libres.

Antitumoral: Relacionado con lo que impide el crecimiento anormal de las células.

Apresorio: Hifa aplanada, a partir de la cual una pequeña evaginación puede penetrar en una célula huésped.

Ascomicetos: División del reino Fungi. Grupo de hongos en los que las esporas de origen sexual se producen dentro de las ascas. El desarrollo es complejo en la mayoría de las especies, al presentar dos fases reproductoras distintas: la fase sexual (asca), también llamada ascógena o perfecta, y la fase conídica o asexual, también conocida como imperfecta.

Basidiomicetos: División del reino Fungi que incluye los hongos que producen basidios con basidiosporas. Contiene a las clásicas setas y hongos con sombrero.

Basidiospora: Esporas típicas de los basidiomicetos, que se forman en la parte externa del basidio.

Bioactividad: El efecto de un agente determinado en un organismo vivo o en un tejido vivo.

Biopropecto: Relativo a la bioprospección, que es la búsqueda sistemática, clasificación e investigación para fines comerciales u holísticos de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos con valor económico actual o potencial, que forman parte de la biodiversidad.

Biorregulación: Se basa en regular los procesos de autodefensa del organismo frente a las diferentes sustancias patógenas causantes de enfermedad. Involucra compuestos de principios activos naturales y, a diferencia de los medicamentos denominados “químicos”, que suprimen las vías metabólicas, los medicamentos biorreguladores modulan las respuestas biológicas del organismo sin suprimirlas, lo que les otorga su alta tolerabilidad y su ausencia de efectos secundarios.

Biorritmo: Ciclo periódico en la actividad de los procesos vitales de una persona o animal.

Biotransformación: Conversión de una sustancia en otros compuestos por los organismos.

Carcinostática: Concerniente a un efecto inhibitorio sobre el desarrollo o progresión de un carcinoma.

Citocinas: Sustancias elaboradas por las células del sistema inmunitario. Algunas citocinas pueden estimular la respuesta inmunitaria y otras pueden suprimirla.

Citostáticas: Relativo a citostáticos, que son sustancias que detienen la multiplicación de las células, comúnmente se utilizan en el tratamiento contra el cáncer.

Citotóxica: Relativo a citotóxico, que es un agente o sustancia que daña o mata las células o los tejidos.

Cuerpo Fructífero: En basidiomicetos y ascomicetos, estructura multicelular sobre la que se forman otras estructuras productoras de esporas. También llamado esporocarpio.

Daño Oxidativo: Daño causado por un exceso en la concentración de radicales libres en el cuerpo o también llamado estrés oxidativo. El daño oxidativo contribuye a la aparición y aceleración de enfermedades específicas y al deterioro progresivo de las funciones vitales.

Densidad Óptica: Absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda determinada.

Deuteromicetos: También llamados hongos imperfectos, comprenden más de 15000 especies diferentes que se clasifican juntas porque no se conoce en ellas la fase sexual de reproducción. Se trata de hongos de los filos Ascomycota y Basidiomycota que se reproducen asexualmente. Son de gran importancia para el hombre por ser el filo de mayor patogenicidad humana dentro del reino Fungi. Muchos también son saprófitos.

Diferenciación: En células, es el conjunto de cambios biológicos para especializarse.

Efecto Antinociceptivo: Reducción de la sensibilidad a los estímulos dolorosos.

Endotelio: Epitelio plano simple formado por células endoteliales, recubre el interior de todos los vasos sanguíneos incluido el corazón, donde se llama endocardio.

Epigeo: Que se desarrolla sobre el suelo.

Esclerocios: Estructuras formadas por grupos de hifas estrechamente unidas para formar cuerpos esferoidales o alargados muy duros. Se trata de una estructura de resistencia con la que el hongo puede sobrevivir en condiciones ambientales adversas.

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO): Incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas y altamente reactivas. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran medida, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. Esto lleva a una situación conocida como estrés oxidativo.

Etnomedicinal: Relativo a la etnomedicina, que es el conjunto de las técnicas y saberes que, transmitidos de forma tradicional se utilizan para la prevención y curación de enfermedades.

Extracto: Sustancia obtenida por extracción de alguna materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.

Fisiógrafo: Instrumento que sirve para medir una constante fisiológica, dicho instrumento traduce una señal a un tipo de escritura que se pueda interpretar.

Fitopatógenos: Organismos (por lo general microorganismos) que causan enfermedades a las plantas.

Fructificación: Acción y efecto de formar y producir frutos. Metafóricamente se llama también a los aparatos esporíferos.

Genoprotectivo: Que otorga protección al ADN.

Glucogénico: Glucoformador. Que da lugar a glucosa.

Heterogeneidad: Cualidad de heterogéneo. Mezcla de partes de diversa naturaleza en un todo.

Hidrólisis: Reacción química o proceso en el cual un compuesto químico es descompuesto por la reacción con el agua. Este es el tipo de reacción que es usada para descomponer ciertos polímeros, y es generalmente catalizada por un álcali o ácido.

Hipogeo: Que se desarrolla bajo el suelo.

Homeostasis: Es la característica de un sistema abierto o de un sistema cerrado, especialmente en un organismo vivo, mediante la cual se regula el ambiente interno para mantener una condición estable y constante.

Hongo Endofítico: Hongo endosimbionte, que vive dentro de una planta por al menos una parte de su vida sin causar una enfermedad aparente.

Inmunomoduladores: Sustancias que regulan, aumentando o disminuyendo, las funciones inmunológicas.

Lectina: Glicoproteínas cuyo papel principal está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular. Las lectinas pueden unirse al exterior de las células y causar cambios bioquímicos en ellas. Este tipo de moléculas se encuentran presentes en la mayoría de los seres vivos.

Melanizada: Que contiene o posee melanina.

Metabolito Bioactivo: Metabolito causante de efectos biológicos y/o toxicológicos.

Metabolito Secundario: Compuesto orgánico sintetizado por un organismo que no tiene un papel directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente.

Micelio: Masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

Mitógeno: Factor que actúa en el ciclo celular estimulando la división celular.

Motilidad: Facultad de moverse.

Mutagenicidad: Capacidad de inducir mutaciones genéticas.

Neuropéptidos: Pequeñas moléculas parecidas a proteínas con enlace peptídico de dos o más aminoácidos. Se diferencian de proteínas por su longitud, y porque se originan por transducción sináptica cerebral. Tienen función cerebral tanto estimulante como inhibidora.

Neurotransmisor: Sustancia química que transmite información de una neurona a otra atravesando el espacio que separa dos neuronas consecutivas (la sinapsis). El neurotransmisor se libera en la extremidad de una neurona durante la propagación del impulso nervioso, y actúa en la neurona siguiente fijándose en puntos precisos de la membrana de esa otra neurona.

Pellet: Denominación genérica, no española, utilizada para referirse a pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido. El término es utilizado para referirse a diferentes materiales.

Peroxidación Lipídica: Proceso en el cual los ácidos grasos y el colesterol, lípidos mayoritarios en sangre, por acción de los radicales libres se transforman en los correspondientes productos oxidados que pierden su función original. Este proceso es responsable, entre otros, de la aterosclerosis.

Polimerización: Reacción química en la que dos o más moléculas se combinan para formar otra en la que se repiten unidades estructurales de las primitivas.

Pool: Acervo, fondo común, reserva, fuente.

Primordios: Relativo a primordio, que es la primera fase del nacimiento de una seta.

Promicelio: Tubo de germinación producido por una teliospora de un hongo del grupo de las royas o de los tizones (denominado también epibasidio).

Promutagenicidad: Capacidad de promover mutaciones genéticas. Permite daño en los genes para progresar a mutación y cáncer.

Proteína G: Transductor de señales que lleva información desde el receptor hasta una o más proteínas efectoras.

Quelación: Reacción química en la que dos o más grupos de una misma molécula ceden un par de electrones cada una a un ión metálico para formar un quelato.

Radicales Libres: Compuestos altamente reactivos que interaccionan rápida y agresivamente con otras moléculas. Químicamente, son moléculas en cuya última órbita existe un electrón impar, inestable y altamente reactivo, que necesita "robar" o "donar" un electrón a otro átomo, que a su vez se transforma en un radical libre, lo que genera una

reacción en cadena. Los radicales libres están implicados en muchas funciones celulares y son un componente común de los organismos vivos.

Radionucléidos: Elementos químicos con configuración inestable que experimentan una desintegración radioactiva que se manifiesta en la emisión de radiación.

Radioprotectivas: Relativo a radioprotector, que es una sustancia que proporciona alguna protección contra los efectos dañinos de la radiación.

Rastrojo: Conjunto de restos de tallos y hojas que quedan en el terreno tras cortar un cultivo.

Receptor de Acetilcolina: Proteína integral de membrana que responde a la unión del neurotransmisor acetilcolina. También es llamado receptor colinérgico.

Receptor de Adenosina A₂: Receptores purinérgicos acoplados a proteína G con adenosina como ligando endógeno. El A₂ es responsable de la regulación del flujo sanguíneo miocárdial por vasodilatación de las arterias coronarias.

Receptor Muscarínico: Receptor de acetilcolina que también logra unirse específicamente con la muscarina; también es llamado receptor de acetilcolina “metabotrópico”.

Receptor Nicotínico: Receptor de acetilcolina que también logra unirse específicamente con la nicotina; también es llamado receptor de acetilcolina “ionotrópico”.

Reflujo: Técnica experimental de laboratorio para el calentamiento de reacciones que transcurren a temperatura superior a la ambiente y en las que conviene mantener un volumen de reacción constante.

Residuos Lignocelulósicos: Residuos vegetales provenientes de la biomasa de la planta que se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Retículo Sarcoplasmático: Es el retículo endoplasmático de las células musculares. Se especializa en el almacenamiento de Ca²⁺, y cuando lo libera hacia el citoplasma se da la contracción muscular. Se encuentra dispuesto en forma de redes que circundan un grupo de miofilamentos.

Saprófitos: Organismos heterótrofos que obtienen su energía de materia orgánica muerta o de los detritos desechados por otros seres vivos, de los cuales extrae los compuestos orgánicos que requiere como nutrientes.

Septado: Dividido en compartimentos por medio de paredes transversales (septos).

Soro: En los hongos, cúmulo de esporas o masas de esporas en vías de expulsión, como en las royas y tizones.

Suspensión: Mezcla heterogénea formada por un sólido en polvo o pequeñas partículas no solubles que se dispersan en un medio líquido o gaseoso.

Teliospora: Espora de resistencia con una pared gruesa, bicelular con cada célula dicariótica. Característica de las royas, siendo la fase perdurante durante el invierno.

Termolábil: Que se altera con facilidad por la acción del calor.

Transductor Isotónico: Un transductor es un dispositivo capaz de transformar o convertir un determinado tipo de energía de entrada, en otra diferente a la salida. Los transductores isotónicos son clásicamente usados para medir la amplitud de la contracción de músculos aislados en estudios de baño de órganos, es decir, los cambios en la longitud de tejidos observados bajo una carga constante.

Trufa: Nombre con el que se indican numerosos hongos Ascomicetos de la familia Tuberales (orden Tuberales), algunos de los cuales son comestibles, de sabor agradable, aromático, muy apreciados para condimentos y como alimento; las trufas viven bajo el suelo en simbiosis micorrízica con las raíces de encinos, sauces, avellanos; cuerpo fructífero voluminoso, liso o rugoso, redondeado, de consistencia carnosa, formado por hifas densamente entrecruzadas, con muchas concameraciones irregulares retorcidas, cuyas paredes están revestidas por el himenio que lleva las ascas.

Umami: Es uno de los cinco gustos básicos que reconocen los receptores especializados de la lengua humana, además de dulce, salado, amargo y ácido.

Ustilaginales: Es un orden de hongos perteneciente a la clase Ustilaginomycetes. El grupo de los Ustilaginales comprende los hongos conocidos como carbones por el aspecto negro y pulverulento de sus masas de esporas. Todos son patógenos de plantas vasculares, generalmente gramíneas, y suelen atacar las partes florales de las mismas.

Viales: Frascos de vidrio o plástico.

Vortex: También llamado mezclador de vórtice, es un dispositivo simple que se usa comúnmente en los laboratorios para agitar pequeños tubos o frascos de líquido.



13. BIBLIOGRAFÍA

Aghajanyan, A. E.; Hambardzumyan, A. A.; Hovsepyan, A. S.; Asaturian, R. A.; Vardanyan, A. A.; Saghiyan, A. A. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin. *Pigment Cell Res.* 2005, 18; 130-135.

Arora, D. K. 2004. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. Marcel Dekker. 1ª edición. USA. Pags 233-237, 239-240, 244-245.

Beas-Fernández, R.; Guzmán-Maldonado, S. H.; Herrera-Hernández, G.; Pérez-Molphe-Balch, E.; Gámez-Roldán, Y.; Guevara-Lara, F. 2006. Análisis de compuestos fenólicos presentes en huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*). Presentación oral y resumen presentados en el Segundo Congreso Estatal "La Investigación en el Posgrado". Universidad Autónoma de Aguascalientes, 21-24 de Noviembre del 2006.

Beas-Fernández, R.; Guzmán-Maldonado, S. H.; Loarca-Piña, M. G. F.; Chávez-Ortiz, L. I.; González-Díaz, M. C.; Guevara-Lara, F. 2008. Chemical and functional characterization of huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*). Cartel y resumen en memoria en línea (096-12); 2008 IFT Annual Meeting & Food Expo, New Orleans, Louisiana, USA. 28 de Junio a 1 de Julio de 2008.

Biglari, F.; AlKarkhi, A. F. M.; Easa, A. M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry.* 107 (2008): 1636-1641.

Bonatti, M.; Karnopp, P.; Soares, H. M.; Furlan, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry.* 88 (2004): 425-428.

Bor, J. Y.; Chen, H. Y.; Yen, G. C. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (5): 1680-1686.

Borrelli, F.; Capasso, F.; Capasso, R.; Ascione, V.; Aviello, G.; Longo, R.; Izzo, A. A. Effect of *Boswellia serrata* on intestinal motility in rodents: inhibition of diarrhoea without constipation. *British Journal of Pharmacology.* 2006, 148: 553-560.

Brezová, V.; Šlebodová, A.; Staško, A. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*. 114 (2009): 859-868.

Butler, M. J.; Day, A. W. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* 44 (1998): 1115-1136.

Butler, M. J.; Gardiner, R. B.; Day, A. W. Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi?. *Biological Control*. 32 (2005):326-336.

Çağlarımak, N. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry*. 105 (2007): 1188-1194.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44 (11): 3426-3431.

Carrillo-Díaz, M. I.; Tirado-Estrada, G.; Guevara-Lara, F.; Silos-Espino, H.; Martín del Campo Valle, S.; Moreno Hernández Duque, J.L.; Acero-Godínez, M. G.; Rubio-Franchini, M. C.; Martínez-Villalobos, R.; Beas-Fernández, R. 2008. Caracterización de fibra dietaria y capacidad antioxidante del hongo del huitlacoche (*Ustilago maydis*). Cartel presentado en el Noveno Seminario de Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. 20-22 de Mayo de 2008.

Chen, S. R.; Jiang, B.; Zheng, J. X.; Xu, G. Y.; Li, J. Y.; Yang, N. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chemistry*. 111 (2008): 745-749.

Chung, H.; Hogan, S.; Zhang, L.; Rainey, K.; Zhou, K. Characterization and comparison of antioxidant properties and bioactive components of Virginia soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (23): 11515-11519.

Corral-Aguayo, R. D.; Yahia, E. M.; Carrillo-Lopez, A.; Gonzalez-Aguilar, G. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (22): 10498-10504.

Cortright, D. N.; Szallasi, A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur. J. Biochem.* 271 (2004): 1814-1819.

De Angelis, F.; Arcadi, A.; Marinelli, F.; Paci, M.; Botti, D.; Pacioni, G.; Miranda, M. Partial structures of truffle melanins. *Phytochemistry.* 1996, 43 (5): 1103-1106.

Dubost, N. J.; Ou, B.; Beelman, R. B. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry.* 105 (2007): 727-735.

Eglen, R. M.; Reddy, H.; Watson, N.; Challiss, R. A. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994, 15 (4): 114-119.

Gage, M. J.; Rane, S. G.; Hockerman, G. H.; Smith, T. J. The virally encoded fungal toxin kp4 specifically blocks l-type voltage-gated calcium channels. *Mol. Pharmacol.* 2002, 61 (4): 936-944.

Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48 (10): 4581-4589.

Goncalves, R. de C. R.; Pombeiro-Sponchiado, S. R. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28 (6): 1129-1131.

Guevara-Lara, F.; Beas-Fernández, R.; Guzmán-Maldonado, S. H.; Loarca-Piña, M. G. F.; Vasco-Méndez, N. L.; Chávez-Ortiz, L.I.; González-Díaz, M.C. 2008. Propiedades antioxidantes y antimutagénicas del huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*). 2008. Presentación oral y resumen en memoria (pp. 107-109, ISSN 1870-4921), Noveno Seminario de Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. 20-22 de Mayo de 2008.

Guevara-Lara, F.; Espinosa-Alonso, L.G.; Valverde, M. E.; Lygin, A.; Widholm, J.; Paredes López, O. 2006. Chemistry and Flavor of Hispanic Foods. ACS Symposium Series 946, American Chemical Society. Washington, DC, USA. Pags 77-88.

Gu, F.; Khimani, A.; Rane, S. G.; Flurkey, W. H.; Bozarth, R. F.; Smith T. J. Structure and function of a virally encoded fungal toxin from *Ustilago maydis*: a fungal and mammalian Ca²⁺ channel inhibitor. *Structure.* 1995, Aug 15; 3 (8): 805-14.

Guzmán Maldonado, S.H. 2001. Biodiversidad genética y caracterización nutrimental del frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris* L) y su potencial para mejorar al frijol cultivado. Tesis de Doctorado en Biotecnología de Plantas. CINVESTAV-Unidad Irapuato.

Hamilton, A. J.; Gomez, B. L. Melanins in fungal pathogens. *J. Med. Microbiol.* 51 (2002): 189-191.

Harki, E.; Talou, T.; Dargent, R. Purification, characterization and analysis of melanin extracted from *Tuber melaosporum* Vitt. *Food Chemistry.* 1997, 58(1-2): 69-73.

Henson, J. M.; Butler, M. J.; Day, A. W. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37 (1999): 447-471.

Hung, Y. C.; Sava, V. M.; Makan, S. Y.; Cheng, T. H.; Hong, M. Y.; Huang, G. S. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states. *Food Chemistry.* 78 (2002): 233-240.

Hung, Y. C.; Sava, V. M.; Makan, S. Y.; Hong, M. Y.; Huang, G. S. Preventive effect of *thea sinensis* melanin against acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52 (16), 5284-5289.

Jacobson E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews.* 2000, 13 (4): 708–717.

Jimenez-Alvarez, D.; Giuffrida, F.; Vanrobaeys, F.; Golay, P. A.; Cotting, C.; Lardeau, A.; Keely, B. J. High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (10), 3470-3477.

Juntes, P.; Rebolj, K.; Sepčić, K.; Maček, P.; Žužek, M. C.; Cestnik, V.; Frangež, R. Ostreolysin induces sustained contraction of porcine coronary arteries and endothelial dysfunction in middle- and large-sized vessels. *Toxicon.* 54 (2009): 784-792.

Kim, M. Y.; Seguin, P.; Ahn, J. K; Kim, J. J.; Chun, S. C.; Kim, E. H.; Seo, S. H.; Kang, E. Y.; Kim, S. L.; Park, Y. J.; Ro, H. M.; Chung, I. M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (16), 7265-7270.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Krämer, K.; Hoppe, P. P.; Packer, L. 2001. Nutraceuticals in Health and Disease Prevention. Marcel Dekker, Inc. 1ª edición. USA. Pags 1-7.

Langfelder, K.; Streibel, M.; Jahn, B.; Haase, G.; Brakhage, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 38 (2003): 143-158.

Latocha, M.; Chodurek, E.; Kurkiewicz, S.; Świątkowska, L.; Wilczok, T. Pyrolytic GC-MS analysis of melanin from black, gray and yellow strains of *Drosophila melanogaster*. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 56 (2000): 89-98.

Lee, Y. L.; Yen, M. T.; Mau, J. L. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chemistry*. 104 (2007): 1-9.

Lindequist, U.; Niedermeyer, T. H. J.; Jülich W. D. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM*. 2005, 2 (3): 285-299.

Lo, K. M.; Cheung, P. C. K. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*. 89 (2005): 533-539.

Mahattanatawee, K.; Manthey, J. A.; Luzio, G.; Talcott, S. T.; Goodner, K.; Baldwin, E. A. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *J. Agric. Food Chem*. 2006, 54 (19): 7355-7363.

Martínez, G.; Bautista, M.; Paredes, O. 2001. Biotecnología para la producción y conservación de hongos comestibles: El cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Universidad de Guanajuato. México. 68 pp.

Marxen, K.; Vanselow, K. H.; Lippemeier, S.; Hintze, R.; Ruser, A.; Hansen, U. P. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*. 2007, 7: 2080-2095.

Mattila, P.; Knk, K.; Euroola, M.; Pihlava, J. M.; Astola, J.; Vahteristo, L.; Hietaniemi, V.; Kumpulainen, J.; Valtonen, M.; Piironen, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem*. 2001, 49 (5): 2343-2348.

Mau, J. L.; Chao, G. R.; Wu, K. T. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49 (11): 5461-5467.

Milner, J. A. Functional foods: The US perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2000. 71 (suppl): 1654S-9S.

Mizuno, T. Special Issue on mushrooms: The Versatile Fungus-Food and medicinal properties. *Food Reviews International.* 1995. 11 (1) 3-4, 7-21, 185-187.

Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004, 26 (2): 211-219.

Moon, J. K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57 (5): 1655-1666.

Oleynek, J. J.; Sedlock, D. M.; Barrow, C. J.; Appell, K. C.; Casiano, F.; Haycock, D.; Ward, S. J.; Kaplita, P.; Gillum, A. M. WIN 64821, a novel neurokinin antagonist produced by an *Aspergillus* sp. II. Biological activity. *The Journal of Antibiotics.* 1994, 47 (4): 399-410.

Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 (11): 3122-3128.

Paredes-López, O.; Guevara-Lara, F.; Bello-Pérez, L. A. 2006. Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericanas. 1ª edición. FCE, SEP, CONACYT, CAB. México. Pag. 134-148.

Paredes López, O.; Valverde; M. E. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *Cinvestav.* 2006, Julio–Septiembre. 65-72.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (10): 4290-4302.

Puttaraju, N. G.; Venkateshaiah, S. U.; Dharmesh, S. M.; Nanjaraj, S. M.; Somasundaram, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (26): 9764-9772.

Schachter, E. N.; Zuskin, E.; Goswami, S.; Castranova, V.; Arumugam, U.; Whitmer, M.; Siegel, P.; Chiarelli, A.; Fainberg, J. Pharmacological study of oyster mushroom (*pleurotus ostreatus*) extract on isolated guinea pig trachea smooth muscle. *Lung.* 183 (2005): 63-71.

Seeram, N. P.; Aviram, M.; Zhang, Y.; Henning, S. M.; Feng, L.; Dreher, M.; Heber, D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (4): 1415-1422.

Serpen, A.; Capuano, E.; Fogliano, V.; Gökmen, V. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55 (19): 7676-7681.

Shahidi, F.; Naczki, M. 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. 1ª edición. CRC Press. USA. Pags. 1-14.

Shan, B.; Cai, Y. Z.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (20): 7749-7759.

Shcherba, V. V.; Babitskaya, V. G.; Kurchenko, V. P.; Ikonnikova, N. V.; Kukulyanskaya, T. A. Antioxidant properties of fungal melanin pigments. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2000, 36 (5): 491-495.

Sigma-Aldrich. Ciocalteu's phenol reagent (F9252) Product Information Sheet.

Singleton, V.L.; Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* 1999, 299: 152-178.

Snchez, A.; Ysunza, F.; Beltran, M. J.; Esqueda, M. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 (9): 2537-2542.

Stratil, P.; Klejdus, B.; Kubáň. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-Evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (3): 607-616.

Suryanarayanan, T. S.; Ravishankar, J. P.; Venkatesan, G.; Murali, T. S. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycol. Res.* 2004, 108 (8): 974-978.

Szydłowska-Czerniak, A.; Trokowski, K.; Karlovits, G.; Szlyk, E. Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58 (13): 7502-7509.

Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J. O.; Dommes, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*. 113 (2009): 1226-1233.

Tirado González, D.N. 2008. Comportamiento productivo y capacidad degradativa del hongo *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria. Instituto Tecnológico el Llano Aguascalientes. México. 107 pp.

Tu, Y. G.; Sun, Y. Z.; Tian, Y. G.; Xie, M. Y.; Chen, J. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from the muscles of Thai black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chemistry*. 114 (2009): 1345-1350.

Valverde, M. E.; Paredes López, O.; Pataky, J. K.; Guevara Lara, F. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source – Biology, composition, and production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1995, 35 (3): 191-229.

Velasco, J. y Vargas, E. 2004. Cultivo del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*). [En línea]. Secretaria de la reforma agraria. [Fecha de consulta: 27 Junio 2008]. http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Cultivo_Hongo__Seta.pdf

Wang, H.; Pan, Y.; Tang, X.; Huang, Z. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans* seeds. *LWT*. 39 (2006): 496-502.

Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44 (3): 701-705.

Wang, H. X.; Ooi, V. E.; Ng, T. B.; Chiu, K. W.; Chang, S. T. Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Pharmacol. Toxicol.* 1996, 79 (6): 318-323.

Wang, S. Y.; Lin, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48 (2): 140-146.

Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52 (12): 4026-4037.

www.biopsicologia.net/fichas/page_86.html

Xu, B.; Chang, S. K. C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57 (11): 4754-4764.

Yang J. H.; Lin, H. C.; Mau J. L. Antioxidant properties of several comercial mushrooms. *Food Chemistry.* 77 (2002): 229-235.

Yang, W. M.; Liu, J. K.; Qing, C.; Liu, Y. D.; Ding, Z. H.; Shen, Z. Q.; Chen, Z. H. Albaconol from the mushroom *Albatrellus confluens* induces contraction and desensitization in Guinea pig trachea. *Planta Med.* 2003, 69 (8): 715-719.

Zhou, S. H.; Fang, Z. X.; Lü, Y.; Chen, J. C.; Liu, D. H.; Ye, X. Q. Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pomace. *Food Chemistry.* 112 (2009): 394-399.

Zielinska, D.; Szawara-Nowak, D.; Zielinski, H. Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55 (15): 6124-6131.

Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frígola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry.* 114 (2009): 310-316.

Žužek, M. C.; Maček, P.; Sepčić, K.; Cestnik, V.; Frangež, R. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. *Toxicon*. 48 (2006): 264-271.

