



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



**CONAHCYT**  
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



**TECNM**  
TECNOLÓGICO NACIONAL DE  
MÉXICO



# **TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**

## **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y  
TECNOLÓGICO**

### **TESIS**

“Caracterización química proximal y evaluación antioxidante de los hongos comestibles silvestres *Laccaria laccata*, *Hypomyces lactifluorum*, *Ganoderma brownii* y *Ramaria sp.*, provenientes de San Mateo Rio Hondo, Oaxaca”

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico**

### **PRESENTA**

Monserrat Vargas Rios

### **DIRIGIDA POR:**

Dra. Alma Dolores Pérez Santiago

### **ASESORES**

Dr. Marco Antonio Sánchez Medina  
M.C. Aymara Díaz Barrita

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, noviembre de 2023



### Carta de cesión de derechos

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, el día 05 del mes de Octubre del año 2023, el(la) que suscribe Montserrat Vargas Rios estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, con número de control M 21161688, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis, que se desarrolló bajo la dirección de Alma Dolores Pérez Santiago y cede los derechos del trabajo titulado: "Caracterización química proximal y evaluación antioxidante de los hongos comestibles silvestres Laccaria laccata, Hypomyces lactifluorum, Ganoderma browni y Ramaria sp. provenientes de San Mateo Río Hondo, Oaxaca".

al TecNM/Instituto Tecnológico de Oaxaca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información del presente trabajo no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido solicitándolo a la siguiente dirección o contacto: rvargas051@hotmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

Montserrat Vargas Rios

Nombre y firma



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

**Instituto Tecnológico de Oaxaca**  
División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

Oaxaca de Juárez, Oax., 22/agosto/2023

Oficio No. DEPI-755/2023

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**ING. HUITZILÍ DÍAZ JAIMES**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES.**  
**P R E S E N T E**

Por este medio comunico a usted, que de acuerdo con las disposiciones establecidas en los Lineamientos para la operación de estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, la estudiante **Monserrat Vargas Rios** con número de control M21161688, ha cumplido con todas las recomendaciones que el Comité Revisor hizo respecto a su tesis cuyo título es "Caracterización química proximal y evaluación antioxidante de los hongos comestibles silvestres *Laccaria laccata*, *Hypomyces lactiflourum*, *Ganoderma brownii* y *Ramaria sp.* provenientes de San Mateo Río Hondo, Oaxaca", para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico.

Por lo anterior, la División a mi cargo le concede la autorización para que proceda el trámite correspondiente y la impresión de la misma.

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
"Tecnología Propia e Independencia Económica"

**EDUCACIÓN**  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

MASM/FFA/\*cmh



Ingeniero Bravo Ahuja No. 123 esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030.  
Tel. (951) 5015016 e-mail: correo@tecnm.mx | www.oaxaca.tecnm.mx



**2023**  
**Francisco**  
**VILLA**

Oaxaca de Juárez, Oax., **22/agosto/2023**

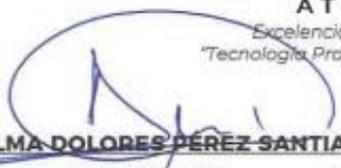
Oficio No. DEPI-756/2023

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis.

**C. MONSERRAT VARGAS RIOS**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAestrÍA EN CIENCIAS**  
**EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO**  
**P R E S E N T E.**

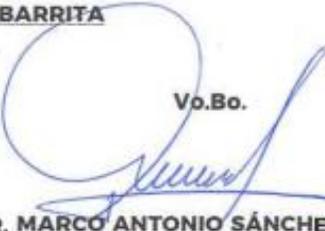
De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo con respecto a su Tesis para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es "Caracterización química proximal y evaluación antioxidante de los hongos comestibles silvestres *Laccaria laccata*, *Hypomyces lactiflorum*, *Ganoderma brownii* y *Ramaria sp.*, provenientes de San Mateo Río Hondo, Oaxaca", los abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora le concedemos la autorización para que proceda a la Impresión de la misma.

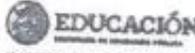
**ATENTAMENTE**  
Excelencia en Educación Tecnológica  
"Tecnología Propia e Independencia Económica"

  
**DRA. ALMA DOLORES PÉREZ SANTIAGO**  
**DIRECTORA**

  
**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA**  
**ASESOR**

  
**M.C. AYMARA DÍAZ BARRITA**  
**ASESORA**

  
Vo.Bo.  
**DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

 **EDUCACIÓN** |   
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA**  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

MASM/FFA\*cmh



Avenida Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125 Esquina Calzada Tecnológico, C.P. 69030.  
Tel. (951) 5015015 e-mail: correo@tecnm.mx | www.oaxaca.tecnm.mx



## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

A el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías.

A la Dra. Alma Dolores Pérez Santiago por dirigir y asesorar este trabajo y por su apoyo incondicional.

A mis asesores por dedicar tiempo de revisión y acompañamiento en la realización de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio por instruirme en los primeros días.

Especialmente le dedico este trabajo a mi familia, a mi hija que es el motivo más grande que tengo para superarme en todos los aspectos.

Agradezco a mis padres, que con cariño y perseverancia, me dieron la mejor herencia que para mí es la educación, por enseñarme a cumplir mis metas y por no rendirse nunca conmigo, les dedico esta tesis que es fruto de mi esfuerzo y todo lo aprendido durante estos años de vida.

## RESUMEN

Los hongos silvestres comestibles son de gran importancia por su valor nutricional y/o medicinal. Éstos organismos han adquirido gran interés debido a que varios estudios revelan los beneficios de algunos metabolitos secundarios bioactivos que producen, entre los que destacan los compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo fue determinar las propiedades antioxidantes de hongos silvestres comestibles recolectados en el bosque de San Mateo Rio Hondo, Oaxaca, cuyas condiciones climáticas favorecen el desarrollo de hongos silvestres comestibles principalmente en temporada de lluvias. Se realizó el análisis químico proximal de las especies y se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, se determinó la actividad antioxidante total, el poder reductor y la capacidad antioxidante por el método de DPPH de cuatro especies: *Laccaria laccata*, *Hypomyces lactifluorum*, *Ganoderma brownii* y *Ramaria sp.* *L. laccata* resultó ser la especie con mayor poder reductor (58.2317 mg EAA/g) y actividad antioxidante total (14.2135 mg EAA/g), la mayor concentración de compuestos fenólicos totales (8.0088 mgEAG/g) fue de *Ramaria sp.* y de flavonoides (4.7084 mgEQ/g) fue de *L. laccata* y el % de inhibición más alto medida con la técnica de DPPH fue de 87.7026% de la especie *G. brownii*. Dos especies de hongos (*L. laccata* y *Ramaria sp.*) se cultivaron *in vitro* y se observó una actividad antioxidante en *L. laccata* de 18.8489 mgEAA/g, la mayor composición tanto de fenoles totales (5.6337 mgEAG/g) como flavonoides totales (3.1953 mgEQ/g) fue de *L. laccata*. Los cultivos *in vitro* de *L. laccata* y *Ramaria sp.* pueden ser utilizados para la producción de metabolitos biológicamente activos.

## ABSTRACT

Edible wild mushrooms are of great importance for their nutritional and/or medicinal value. These organisms have acquired great interest because several studies reveal the benefits of some bioactive secondary metabolites they produce, among which phenolic compounds stand out. The objective of this work was to determine the antioxidant properties of edible wild mushrooms collected in the forest of San Mateo Rio Hondo, Oaxaca, whose climatic conditions favor the development of edible wild mushrooms mainly in the rainy season. The proximal chemical analysis of the species was carried out and the quantification of total phenolic compounds and total flavonoids was carried out, the total antioxidant activity, the reducing power and the antioxidant capacity were determined by the DPPH method of four species: *Laccaria laccata*, *Hypomyces lactifluorum*, *Ganoderma brownii* and *Ramaria sp.* *L. laccata* turned out to be the species with the highest reducing power (58.2317 mg EAA/g) and total antioxidant activity (14.2135 mg EAA/g), the highest concentration of total phenolic compounds (8.0088 mgEAG/g) was from *Ramaria sp.* and flavonoids (4.7084 mgEQ/g) was from *L. laccata* and the highest % inhibition measured with the DPPH technique was 87.7026% from the *G. brownii* species. Two species of fungi (*L. laccata* and *Ramaria sp.*) were grown in vitro and an antioxidant activity was observed in *L. laccata* of 18.8489 mgEAA/g, the highest composition of both total phenols (5.6337 mgEAG/g) and total flavonoids (3.1953 mgEQ/g) was from *L. laccata*. In vitro cultures of *L. laccata* and *Ramaria sp.* can be used for the production of biologically active metabolites.

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	2
2.1. Generalidades de los hongos .....	2
2.1.1. ¿Qué son los hongos? .....	2
2.1.2. Nutrición de los hongos .....	2
2.1.3. Reproducción de los hongos .....	3
2.2. Hongos silvestres comestibles .....	5
2.2.1. Características físicas de los hongos silvestres comestibles .....	5
2.2.2. Hongos silvestres comestibles en México y Oaxaca .....	8
2.3. Importancia de los hongos silvestres comestibles .....	10
2.3.1. Metabolitos secundarios fúngicos de interés .....	10
2.4. Cultivos de hongos <i>in vitro</i> .....	16
2.5. Radicales libres y antioxidantes .....	17
III. ANTECEDENTES .....	2
IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
V. HIPÓTESIS .....	2
VI. JUSTIFICACIÓN .....	2
VII. OBJETIVOS .....	3
VIII. METODOLOGÍA .....	24
8.1. Recolección del material fúngico e identificación de las especies .....	24
8.2. Tratamiento de las muestras .....	25
8.3. Análisis químico proximal .....	25
8.3.1. Determinación de proteínas. Determinación de proteínas. Método de Kjeldahl. Basado de en método AOAC 920.87. ....	25
8.3.2. Determinación de extracto etéreo. Método de Soxhlet. Basado en el método de la AOAC 920.39. ....	26
8.3.3. Determinación de cenizas basado en el método AOAC 923.03. ....	27
8.3.4. Determinación de humedad por el método de estufa (NMX-F-294-SCFI-2011) .....	27
8.3.5. Determinación de fibra según la norma NMX-Y-094-SCFI-2012 .....	28
8.3.6. Determinación de carbohidratos .....	29
8.4. Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> .....	29

8.4.1.	Aislamiento por medio de tejido.....	29
8.4.2.	Crecimiento en medio líquido.....	30
8.5.	Obtención de los extractos.....	30
8.5.1.	Obtención de extractos a partir del hongo seco .....	30
8.5.2.	Obtención de extractos a partir de la biomasa producida.....	30
8.6.	Evaluación de la actividad antioxidante total.....	30
8.7.	Determinación de compuestos fenólicos totales.....	31
8.8.	Determinación de flavonoides totales .....	32
8.9.	Método del DPPH .....	33
8.10.	Evaluación de la reducción de ferrocianuro .....	33
8.11.	Determinación de la presencia de algunos metabolitos secundarios .....	34
8.11.1.	Alcaloides .....	34
8.11.2.	Saponinas .....	34
8.11.3.	Flavonoides .....	35
8.11.4.	Taninos .....	35
8.11.5.	Quinonas.....	35
8.11.6.	Cumarinas.....	36
8.11.7.	Glucósidos cardiotónicos.....	36
8.11.8.	Lactonas sesquiterpénicas.....	36
8.12.	Análisis de datos.....	37
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
9.1.	Resultados del análisis químico proximal.....	39
9.2.	Evaluación antioxidante .....	41
9.3.	Aislamiento de los hongos seleccionados.....	43
9.4.	Identificación de metabolitos secundarios .....	45
X.	CONCLUSIONES.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Nutrición de un hongo representada a partir de una hifa.....	3
Figura 2.2. Origen de las esporas .....	4
Figura 2.3. Ciclo de vida general de un miembro típico de <i>Agaricomycetes</i> (Basidiomycota).....	5
Figura 2.4. Partes de un hongo comestible .....	6
Figura 2.5. Especies de hongos basidiomicetos.....	7
Figura 2.6. Mapa de la ubicación de San Mateo Rio Hondo.....	9
Figura 2.7. Grupo fenol .....	12
Figura 2.8. Estructura general de los flavonoides.....	14
Figura 2.9. Estructuras químicas de los subgrupos de flavonoides .....	14
Figura 8.1 Diagrama de flujo para la elaboración del proyecto. ....	24
Figura 9.1. <i>Hypomyces lactiflorum</i> . Especie recolectada en San Mateo Rio Hondo. ....	38
Figura 9.2. <i>Ramaria sp.</i> Especie recolectada en San Mateo Rio Hondo. ....	38
Figura 9.3. <i>Agaricus bisporus</i> . Especie comercial. ....	39
Figura 9.6. Cultivos in vitro de hongos seleccionados de San Mateo Rio Hondo .....	44
Figura 9.7. Curva de crecimiento de <i>Ramaria sp.</i> ....	44
Figura 9.8. Curva de crecimiento de <i>L. laccata</i> . ....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Identificación de algunos metabolitos secundarios producidos por algunos hongos comestibles. (-) ausencia (+) presencia. ....	11
Tabla 2.2 Efecto medicinal y compuestos bioactivos de hongos silvestres comestibles. ....	13
Tabla 2.3. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de especies de hongos silvestres comestibles de diferentes lugares de recolecta. ....	16
Tabla 9.1. Resultados del análisis químico proximal. ....	39
Tabla 9.2. Resultados de la evaluación antioxidante ....	41
Tabla 9.3. Metabolitos secundarios de los hongos seleccionados. ....	46
Tabla 9.4. Evaluación antioxidante de los cultivos <i>in vitro</i> . ....	47

## I. INTRODUCCIÓN

El estado Oaxaca cuenta con una amplia diversidad de flora, fauna y recursos fúngicos, los cuales también son ampliamente consumidos por sus habitantes. Particularmente el consumo de hongos silvestres es tradicional en algunas zonas del estado, adicionalmente su distribución genera un ingreso económico para las familias que se dedican a venderlos, especialmente durante la temporada de lluvias (Zamora *et al.*, 2014).

El consumo de hongos es importante en nuestra dieta por su valor nutricional y probablemente para favorecer un estado saludable, debido a que ciertos compuestos bioactivos ejercen efectos aditivos y sinérgicos. En las últimas décadas se han considerado como alimento funcional y como una fuente médicamente eficiente en terapias contra el cáncer, antiviral, inmunopotenciadora y actividad hipolipidémica (Rathee *et al.*, 2012; López *et al.*, 2017).

En la actualidad se requiere un análisis minucioso de los diversos beneficios para la salud que los hongos proporcionan a los seres humanos y sus mecanismos de acción. La exploración de hongos silvestres comestibles y la identificación de sus componentes activos con un valor terapéutico potencial sigue siendo un desafío, por lo tanto, los hongos silvestres comestibles seguirán siendo el centro de atención más destacado de la investigación en la perspectiva futura (Rathee *et al.*, 2012).

Debido a la existencia de una gran variedad de hongos en el estado de Oaxaca, es normal encontrar que no han sido estudiados lo suficiente. En la actualidad ha sido muy regular el tema de la producción de compuestos fenólicos en algunas especies de hongos cultivados en medios no naturales, es decir, en el laboratorio. La fermentación sumergida de hongos ha recibido mucha atención como una alternativa prometedora para la producción eficiente de la biomasa de hongos medicinales y sus metabolitos activos (Tang *et al.*, 2007)

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades de los hongos

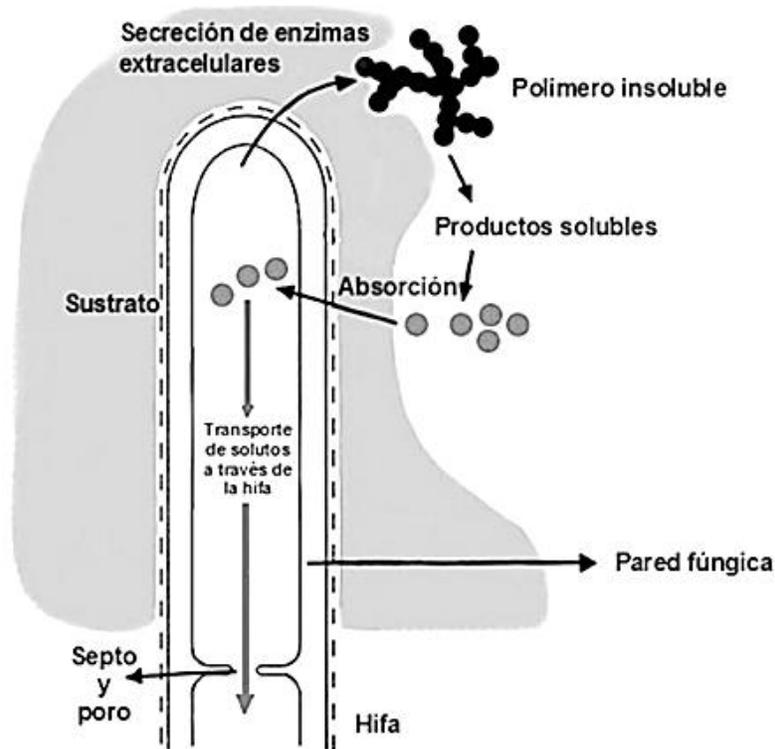
#### 2.1.1. ¿Qué son los hongos?

El reino fungi, referido literalmente a los hongos, está agrupado por una serie de organismos que pueden ser unicelulares o pluricelulares. (Castro & Vega, 2017). Los hongos son heterótrofos y tienen la capacidad de obtener la energía que necesitan a partir de sustancias orgánicas sintetizadas previamente por otros organismos. Las formas de vida de los hongos pueden ser saprofitos, estos descomponen restos orgánicos como maderas, cutículas de insectos, entre otras. Los parásitos adquieren los nutrientes que necesitan de tejidos vivos de otro organismo llamado hospedante, si el hongo parásito enferma al hospedante se denomina patógeno. Los hongos simbióticos se unen a otros organismos y ambos se favorecen (Miralles, 2005).

#### 2.1.2. Nutrición de los hongos

Los hongos pueden crecer en ambientes con cantidades mínimas de nutrientes (orgánicos solubles), los absorben como fuente de energía a través de la pared y la membrana, además debido a que el micelio durante la fase vegetativa es capaz de sintetizar una gran variedad de enzimas hace que los hongos puedan degradar una diversidad de sustratos, algunos complejos como celulosa o lignina (Cepero de García, 2012).

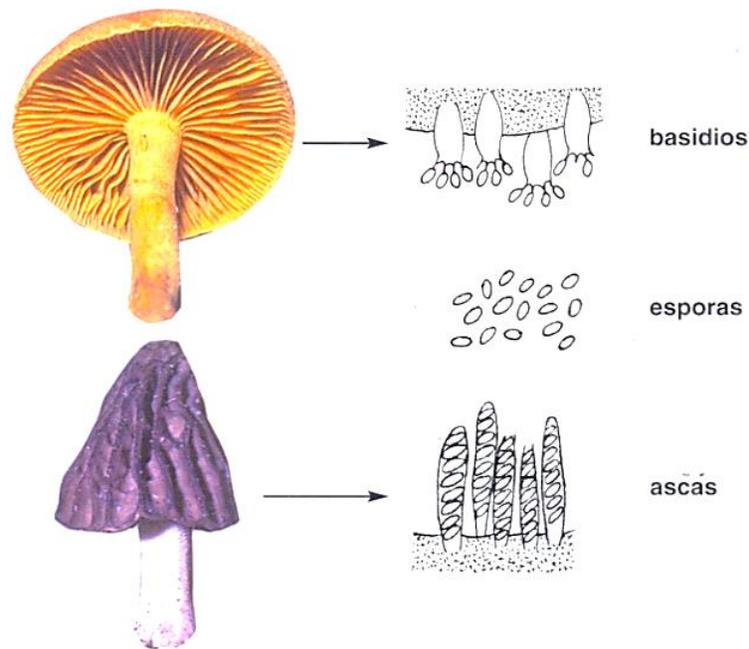
La figura 2.1 es una representación de la nutrición de un hongo a partir de una hifa. Las enzimas extracelulares penetran y degradan el sustrato para la obtención de sustancias solubles que son absorbidas luego por el hongo. Los sustratos en su forma más simple son absorbidos por la hifa y utilizados para el crecimiento y metabolismo (Lechner, Rugolo, & Mallerman, 2018).



**Figura 2.1 Nutrición de un hongo representada a partir de una hifa. (Lechner, Rugolo, & Malleran, 2018).**

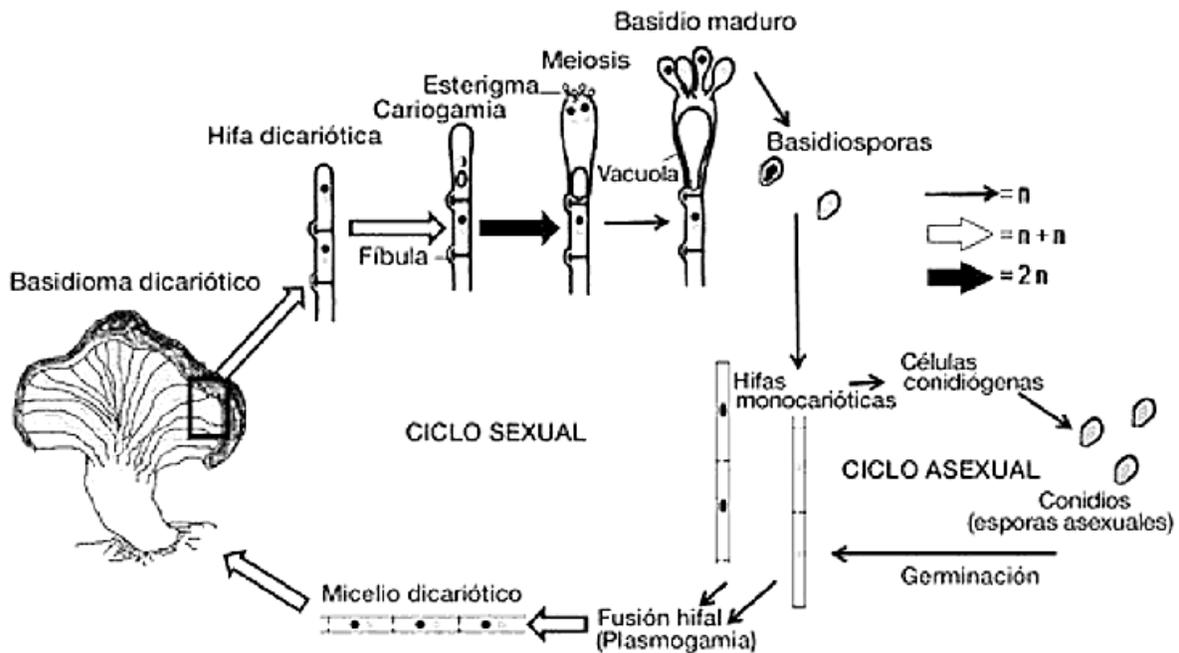
### 2.1.3. Reproducción de los hongos

Algunos hongos forman setas y se reproducen gracias a las esporas que pueden ser sexuales o asexuales (García, 1995). Los ascomicetos tienen ascas, que son células en forma de botella donde se almacenan sus esporas (ver figura 2.2), en la etapa madura las ascas se abren y las esporas son lanzadas al exterior. Existe otro tipo de hongos que contienen sus esporas en prolongaciones exteriores de reducido tamaño cuyo nombre es basidios, se conocen como basidiomicetos (García, 2006).



**Figura 2.2. Origen de las esporas (García, 2006)**

En la figura 2.3 se observa el ciclo de vida de un hongo basidiomycota. La espora da origen a la hifa, las hifas al crecer se ramifican y conforman el micelio. Este micelio primario posee células unicelulares ( $n$ ) y puede fusionarse con un micelio compatible de otro individuo (plasmogamia), lo anterior forma un micelio secundario que contiene dos núcleos en cada célula ( $n+n$ ). A lo largo de la mitosis de una célula con dos núcleos las copias de ambos núcleos se mantienen en la nueva célula gracias a las fibras. Después de un tiempo y con condiciones adecuadas (luz, temperatura, etc.) inducen la fase reproductiva sexual en la que el micelio secundario da origen a tejidos más especializados que forman basidiomas. En estos, está el himenio donde se produce la fusión nuclear de las células dicarióticas del micelio generando basidios, mismos que dividen su núcleo diploide por meiosis para formar células haploides (cuatro células por basidio) que se denominan basidiosporas. Al alcanzar la madurez los basidios que se encuentran en el himenio que está debajo del sombrero, van dejando caer las esporas para comenzar de nuevo el ciclo (Lechner, Rugolo, & Mallerman, 2018; García, 2006).



**Figura 2.3. Ciclo de vida general de un miembro típico de *Agaricomycetes* (Basidiomycota) (Lechner, Rugolo, & Mallerma, 2018).**

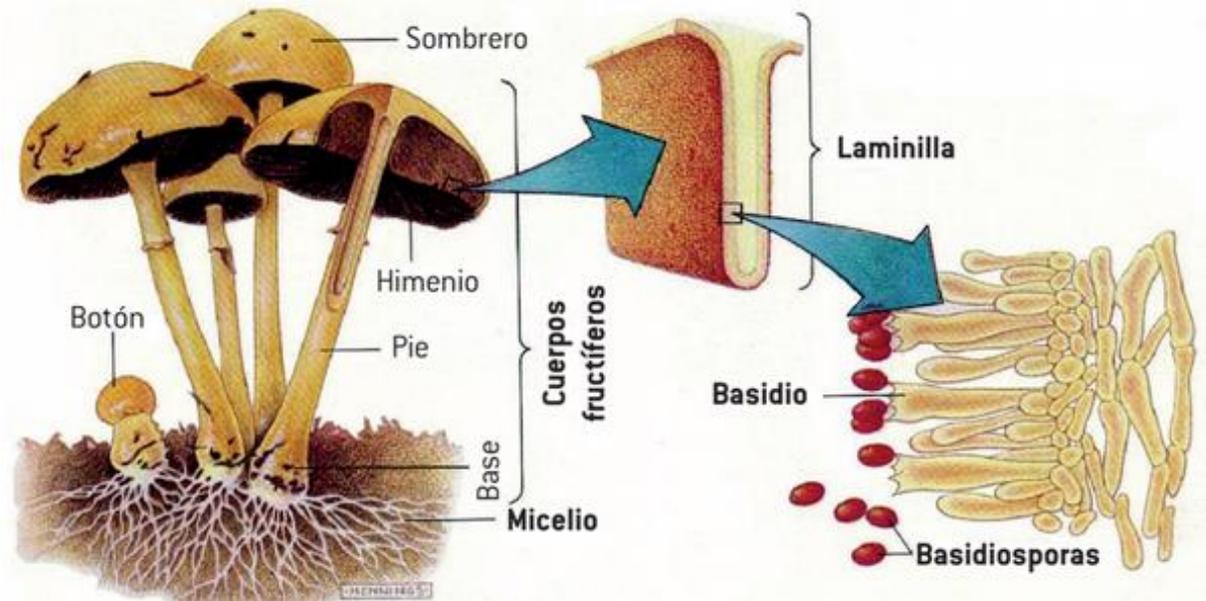
Las esporas asexuales pueden formarse mediante dos mecanismos principales: el primero es mediante esporóforos o el segundo que es la fragmentación de hifas. Algunos tipos de esporas asexuales son los esporangiosporas, conidiosporas, artrosporas y clamidiosporas. (García, 1995). La reproducción asexual es más simple y permite una rápida propagación de la especie (Lechner, Rugolo, & Mallerma, 2018).

## 2.2. Hongos silvestres comestibles

### 2.2.1. Características físicas de los hongos silvestres comestibles

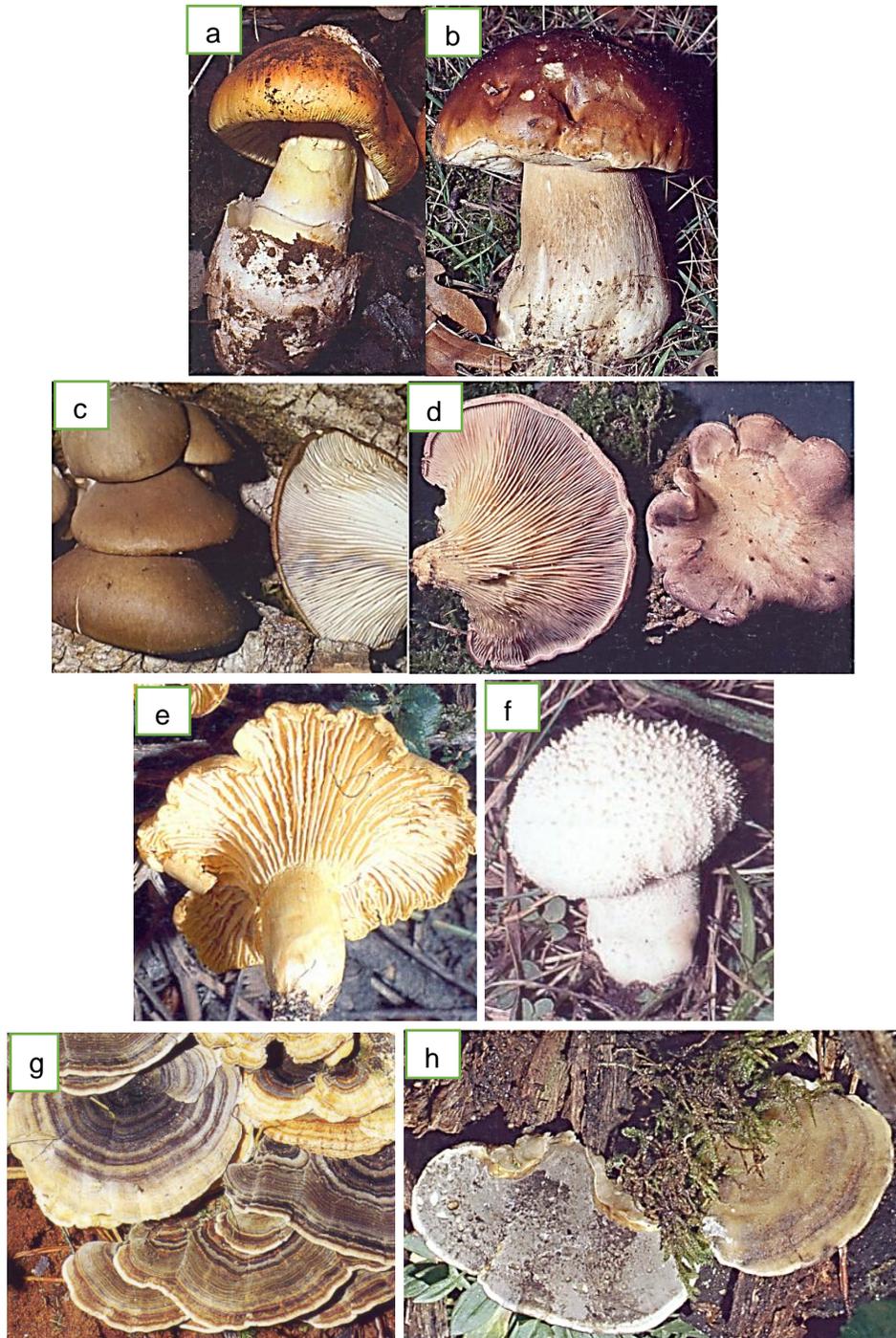
Los hongos silvestres comestibles pertenecen a especies con carpóforos grandes y visibles, también llamados setas, estas son el cuerpo fructífero de un hongo (Boa, 2004; Miralles, 2005). No todos los hongos presentan estas estructuras, las setas corresponden a formas fúngicas evolucionadas, con organización anatómica y compleja (Miralles, 2005).

Las partes de un hongo comestible se ilustran en la figura 2.4 La zona fértil de la seta es el himenio, y puede componerse de láminas, tubos o agujas, para aquella seta que posee sombrero. En el himenio se hallan los basidios, que son células reproductivas encargadas de generar las esporas (Castro & Vega, 2017).



**Figura 2.4. Partes de un hongo comestible (Castro & Vega, 2017)**

Algunos géneros que pertenecen a basidiomicetos son *Amanita*, *Boletus*, *Pleurotus*, *Lentinus Cantharellus cibarius* y *Lycoperdon*; también hay otros basidiomicetos no tienen forma de seta y muchos crecen sobre la madera, ejemplos son los de los géneros *Bjerkandera* y *Trametes*. En la figura 2.5 se aprecian ejemplos de hongos basidiomicetos característicos de cada género anteriormente mencionado (García, 2006).



**Figura 2.5. Especies de hongos basidiomicetos.** a) *Amanita caesarea*. b) *Boletus edulis* c) *Pleurotus ostreatus* d) *Lentinus conchatus* e) *Cantharellus cibarius* f) *Lycoperdon perlatum* g) *Bjerkandera adusta* h) *Trametes versicolor* (García, 2006).

### 2.2.2. Hongos silvestres comestibles en México y Oaxaca

México cuenta con una elevada diversidad de especies fúngicas debido a su ubicación entre las regiones biogeográficas: la neotropical (Suramérica) y la Boreal (Norteamérica). Debido a la existencia de bosques templados de gimnospermas y angiospermas, en el país se ve favorecido el desarrollo de cerca de 200 000 especies de hongos y más de 300 son comestibles, lamentablemente, solo se ha estudiado el 6%, a pesar de los actuales avances tecnológicos (Boa, 2004; Guzmán, 2008).

Más de 70 especies de hongos se utilizan en las prácticas de la medicina tradicional en más de 10 grupos étnicos para tratar más de 40 tipos de deficiencias en la salud de mexicanos. Los problemas de salud más comunes son ansiedad, obesidad, debilidad, necesidad de rejuvenecimiento entre otros. Es interesante observar que existen varios hongos comestibles importantes que se venden en mercados populares, *Amanita caesarea*, *Auricularia spp.*, *Boletus edulis*, *Calvatia cyathiformis*, *Clitocybe gibba*, *Hypomyces lactifluorum*, *Lactarius spp.*, *Langermannia gigantea*, *Lycoperdon perlatum*, *Schizophyllum commune*, *Suillus spp.* y *Ustilago maydis* (Guzmán, 2008).

En Oaxaca se comercializa una gran variedad de hongos silvestres comestibles en mercados como la Central de Abastos, las especies más comercializadas en dichos lugares son: *Amanita caesarea* (Hongo rojo), *Cantharellus cibarius* (flor de calabaza) y *Hydnum repandum* (espinitas, gusanito) (Ruiz *et al.*, 2013).

En Oaxaca hay un municipio cuya vegetación se compone del 89.48% de bosque, donde predomina el clima templado subhúmedo y su temperatura oscila entre 10 y 24°C, estas condiciones favorecen el desarrollo de hongos silvestres comestibles principalmente en temporada de lluvias (verano). Este municipio es San Mateo Río Hondo, pertenece a la sierra madre del Sur y su ubicación geográfica (ver Figura 2.6) es entre los paralelos 16°00' y 16°12' de latitud norte; los meridianos 96°24' y 96°38' de longitud oeste; altitud entre 700 y 3 100 m (INEGI, 2010).

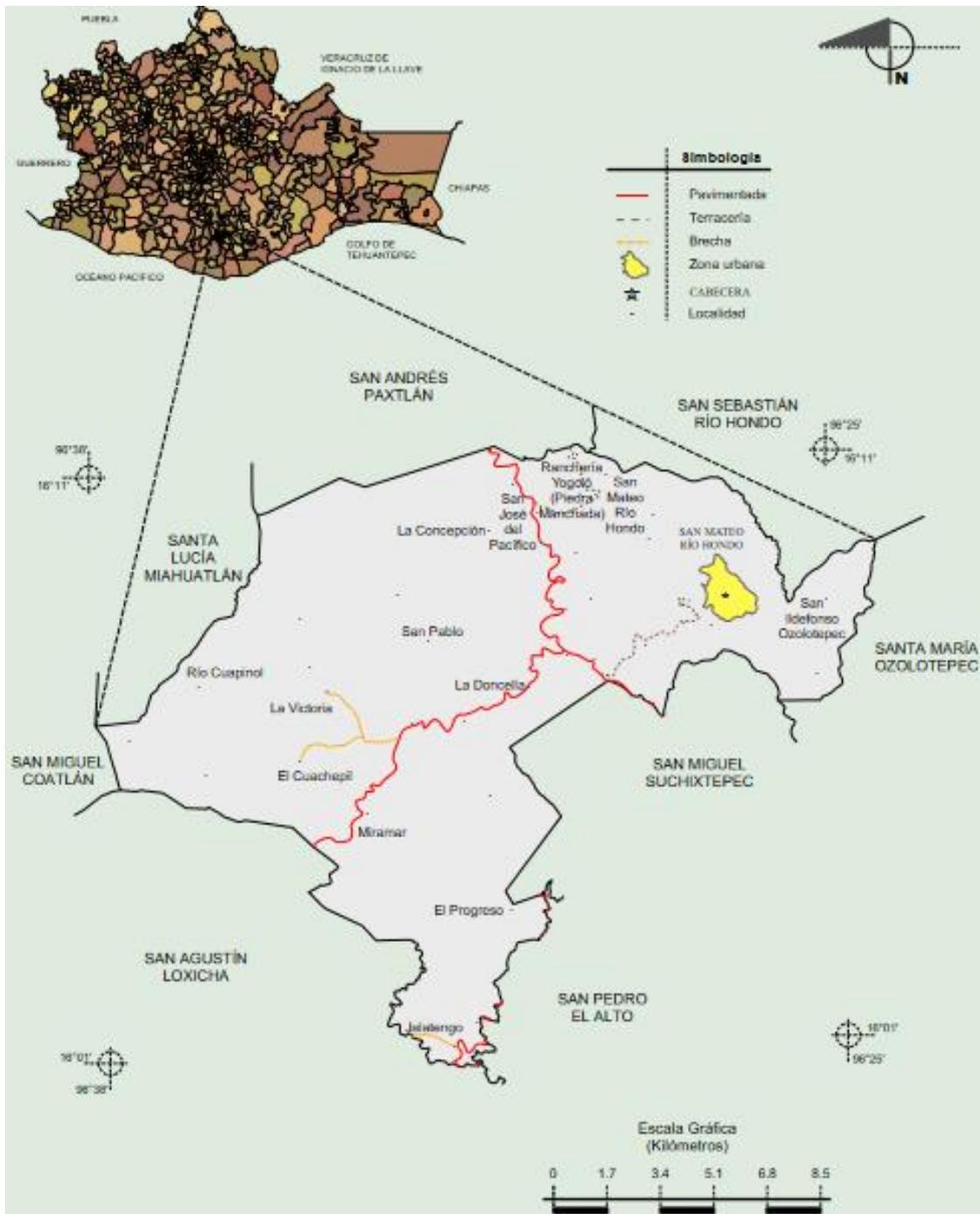


Figura 2.6. Mapa de la ubicación de San Mateo Rio Hondo (INEGI, 2010).

### 2.3. Importancia de los hongos silvestres comestibles

En general, los hongos comestibles silvestres poseen bajos contenidos de grasas y un contenido mayor de proteínas, carbohidratos, minerales y energía. Además, tienen gran cantidad de agua que va del 70 al 90%, como se ha reportado para *Lactarius volemus*, *Cantharellus cibarius* y *Hydnum repandum* (Colak et al., 2009). Heleno et al., 2015 estudiaron tres especies de hongos: *Boletus edulis*, *Lentinus edodes* y *Xerocomus badius*, analizaron sus compuestos fenólicos y tocoferoles y su actividad antioxidante; ellos demostraron que los carbohidratos estaban presentes en abundancia en este tipo de hongos, seguidos de las proteínas, las cenizas y los ácidos grasos (los ácidos grasos poliinsaturados eran más altos que los ácidos grasos saturados).

Se sabe que los hongos no solo realizan el metabolismo primario, su metabolismo secundario conlleva la producción y acumulación de metabolitos que se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos y tienen propiedades biológicas, muchos son utilizados como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Cepero de García, 2012; Verpoorte & Alfermann, 2000).

#### 2.3.1. Metabolitos secundarios fúngicos de interés

En general, los hongos ofrecen una serie de efectos benéficos para la salud con un amplio espectro de propiedades farmacológicas, que incluyen antidiabéticos, antioxidantes, antivirales, antibacterianos, osteoprotectores, nefroprotectores, hepatoprotectores, etc. Tanto los hongos silvestres comestibles como los medicinales poseen fuertes actividades terapéuticas y biológicas, que son evidentes a partir de los ensayos in vivo e in vitro (Anusiya et al., 2021). Además, producen varias clases de metabolitos secundarios con actividad biológica, dentro de los que se han reportado: polisacáridos, triterpenoides, polifenoles, nucleótidos, esteroides, esteroides, fibra dietaria, péptidos, proteínas, alcoholes y minerales (López et al.,

2017). Sin embargo, los compuestos fenólicos han adquirido mayor relevancia por su relación con la capacidad antioxidante.

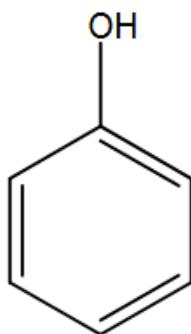
Se han estudiado algunos hongos comestibles y los metabolitos que producen, en la tabla 2.1 se muestran los resultados obtenidos en un estudio fitoquímico realizado con hongos comestibles recolectados en el estado de Durango. En todos los hongos que se muestran en la tabla 2.1 no se identificó la presencia de flavonoides, saponinas ni alcaloides, sin embargo, en la mayoría se identificaron flavonas, taninos y cumarinas que son compuestos fenólicos.

**Tabla 2.1** Identificación de algunos metabolitos secundarios producidos por algunos hongos comestibles. (-) ausencia (+) presencia. Fuente: (Mares, 2014)

Especie	Alcaloides	Flavonas	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Cumarinas
<i>Amanita caesaria</i>	-	+	-	-	-	+
<i>Hypomyces lactiflourun</i>	-	++	-	-	++	+
<i>Ramaria flava</i>	-	++	-	-	-	+
<i>Boletus edulis</i>	-	+++	-	-	-	+
<i>Hericum erinaceus</i>		+	-	-	+	+
<i>Tricholoma magnivelare</i>	-	++	-	-	++	+
<i>Sparassis crispa</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Lycoperdon perlaum</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Lentinula edoles</i>	-	++	-	-	+	+

### 2.3.1.1. Compuestos fenólicos

Se generan en el metabolismo secundario y poseen por lo menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático que es un grupo fenol (Figura 2.7). El enlace fuerte entre el oxígeno del grupo hidroxilo y el anillo fenilo propicia que los fenoles se comporten como ácidos, mientras que el enlace relativamente débil entre el oxígeno y el hidrógeno ocasiona la disociación de un protón que puede ser liberado al medio, originando un ión fenolato con carga negativa (Ringuelet & Viña, 2013).



**Figura 2.7. Grupo fenol (Ringuelet & Viña 2013)**

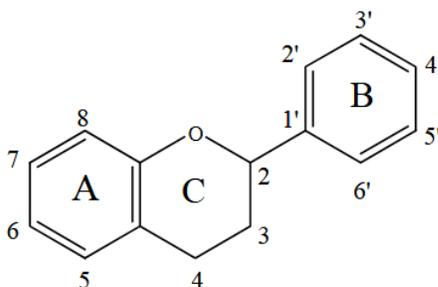
En general los compuestos fenólicos se encuentran formando ésteres, su solubilidad en agua y en disolventes orgánicos es de sus principales características, además se caracterizan por anillos aromáticos que tienen un grupo hidroxilo fenólico (Mello & Santos, 2001; Verpoorte & Alfermann, 2000). En la tabla 2.2, se puede observar la valiosa aportación de los compuestos fenólicos pues son los principales metabolitos secundarios que confieren a los hongos silvestres comestibles la actividad antioxidante como efecto medicinal. Estos compuestos son también responsables de los efectos medicinales que tienen algunas plantas. Gonzalez (2017) encontró en mayor cantidad metabolitos de tipo fenólico en extractos de 3 especies vegetales del género *Hypericum*: *H. mexicanum*, *H. juniperinum* y *H. myricariifolium*.

**Tabla 2.2 Efecto medicinal y compuestos bioactivos de hongos silvestres comestibles. Fuente: propia del autor**

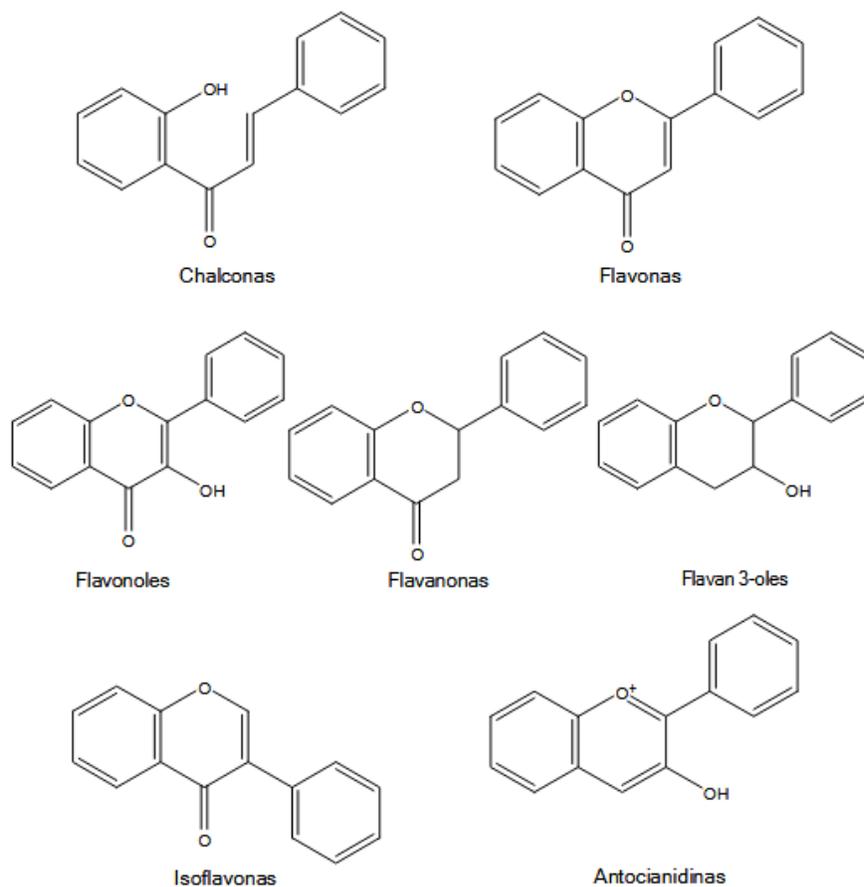
Especie de hongo (nombre popular)	Efecto medicinal	Compuestos bioactivos	Referencia
<i>Agaricus bisporus</i> (Champiñón)	Antioxidante	Compuestos fenólicos Flavonoides	(Mwangi, <i>et al.</i> , 2022; Robaszkiewicz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pleurotus florida</i>	Antioxidante	Compuestos fenólicos $\alpha$ -tocoferol Flavonoides	(Mwangi, <i>et al.</i> , 2022)
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Antioxidante	Compuestos fenólicos	(Mwangi, <i>et al.</i> , 2022)
<i>Ganoderma applanatum</i>	Antioxidante	Compuestos fenólicos	(Mwangi, <i>et al.</i> , 2022)
<i>Calvatia gigantea</i>	Antioxidante	Compuestos fenólicos	(Mwangi, <i>et al.</i> , 2022)
<i>Boletus edulis</i> (panadero, cemita, pancita)	Antioxidante	Compuestos fenólicos Flavonoides	(Mwangi, <i>et al.</i> , 2022; Robaszkiewicz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Hongo ostra, oreja blanca)	Antioxidante	Compuestos fenólicos Flavonoides	(Robaszkiewicz <i>et al.</i> , (2010)
<i>Ramaria botrytis</i> (Hongo coral, escobitas)	Antioxidante	Compuestos fenólicos	(Barros <i>et al.</i> , 2008)
<i>Amanita caesarea</i> (Hongo rojo)	Antioxidante	Compuestos fenólicos	(Mares, 2014)
<i>Hypomyces lactiflorum</i> (oreja de puerco)	Antioxidante	Compuestos fenólicos	(Mares, 2014)
<i>Cantharellus cibarius</i> (flor de calabaza)	Antioxidante	Compuestos fenólicos Flavonoides	(Barros <i>et al.</i> , 2008; Mwangi, <i>et al.</i> , 2022).

Los flavonoides son producto del metabolismo secundario y pertenecen a los compuestos polifenólicos más abundantes. El esqueleto común a todos los flavonoides lo conforman dos anillos de seis átomos de carbono (designados con las letras A y B) unidos mediante un puente de tres átomos de carbono que suele formar un tercer ciclo (anillo C) (Figura 2.8). Se pueden encontrar diferentes estructuras

flavonoides lo que depende del grado de oxidación del anillo central. Algunas clases de flavonoides son: chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianidinas (Figura 2.9) (Ringuelet & Viña 2013).



**Figura 2.8. Estructura general de los flavonoides**



**Figura 2.9. Estructuras químicas de los subgrupos de flavonoides**

Tienen funciones diversas, por ejemplo, los flavonoides purifican la sangre, fortalecen el sistema inmunológico, controlan el nivel de colesterol, regulan la presión arterial, suprimen la secreción de ácido, previenen la formación de trombos, suprimen la citofia, actúan como antibacterianos, antifúngicos, antialérgicos y anticancerígenos, promueven el metabolismo y la actividad vasodilatadora, etc. Los flavonoides son potentes antioxidantes, capaces de eliminar los radicales hidroxilo, los aniones superóxido y los radicales peroxi lipídicos (Bulugahapitiya, 2013).

La capacidad antioxidante de un hongo puede evaluarse por diversas técnicas cuantificando ciertos compuestos como compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, además se puede cuantificar la actividad antioxidante total y la capacidad bloqueadora del radical libre DPPH. Se ha demostrado que estos datos pueden ser muy variables, según la especie estudiada y el área de recolección (Ver tabla 2.3).

En la tabla 2.3 se puede apreciar el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de algunas especies estudiadas, Mares, (2014) analizó algunas especies de hongos comestibles, de las cuales encontró valores de contenido fenólico total de hasta 4.145 mg EAG/mg extracto, y de flavonoides de hasta 2.76 mgEQ/g extracto. Gursoy *et al.*, (2010) encontró valores de contenido fenólico total de hasta 10.51 mg EAG/mg extracto en una especie de Turquía.

**Tabla 2.3. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de especies de hongos silvestres comestibles de diferentes lugares de recolecta.**  
**Fuente: Propia del autor.**

Especie	Lugar de recolecta	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides totales ( $\mu$ g EQ/mg)	Referencia
<i>Ramaria flava</i>	Turkía	10.51	0.50	(Gursoy <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ramaria flava</i>	Durango, México	4.145	0.29	(Mares, 2014)
<i>Rhizopogon roseolus</i>	Turkía	6.65	0.48	(Gursoy <i>et al.</i> , 2010)
<i>Russula delica</i>	Turkía	2.09	0.16	(Gursoy <i>et al.</i> , 2010)
<i>Boletus edulis</i>	Durango, México	2.66	2.77	(Mares, 2014)
<i>Amanita caesarea</i>	Durango, México	3.67	1.25	(Mares, 2014)
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Durango, México	2.65	2.30	(Mares, 2014)
<i>Lactarius deliciosus</i>	Portugal	17.25	8.14	(Barros, L., <i>et al.</i> , 2008)
<i>Sarcodon imbricatus</i>	Portugal	3.76	2.82	(Barros, L., <i>et al.</i> , 2008)
<i>Agaricus bisporus</i>	India	21.17	2.173	(Babu & Rao, 2013)

También se han reportado datos de capacidad antioxidante medida por diferentes métodos, por ejemplo de actividad antioxidante total de hasta 17.9 mg EAA/ mg extracto, capacidad bloqueadora del radical libre DPPH de hasta 1600, de contenido fenólico total de hasta 4.145 mg EAG/mg extracto, y de flavonoides de hasta 2.76 mgEQ/g extracto.

#### 2.4. Cultivos de hongos in vitro

Es posible trabajar con los hongos macromicetos en procesos biotecnológicos para obtener metabolitos de interés, se ha logrado propagar su crecimiento y tener un control de las variables óptimas, por ejemplo mediante fermentación sumergida y en

medio sólido. Por ello es importante monitorear su crecimiento para controlar los procesos fermentativos (Pérez *et al.*, 2017).

Actualmente, muchos hongos medicinales que se comercializan a gran escala se obtienen principalmente a través del cultivo en el campo del cuerpo fructífero. La fermentación sumergida es una opción estudiada en los últimos años no sólo para la producción de la biomasa si no para favorecer las condiciones en las que estos producen ciertos metabolitos secundarios bioactivos de interés (Tang *et al.*, 2007).

Un importante factor a controlar durante estos procesos fermentativos es la viscosidad del cultivo porque se ha demostrado que limita la oxigenación del medio, lo que conlleva la muerte del micelio. Otro factor a considerar es la concentración de glucosa, ya que cuando esta decrece a lo largo del tiempo la producción de fenoles totales se maximiza. Se ha estudiado la cinética y extracción de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* mediante fermentación sumergida, después de 72 h aumentó la producción de polifenoles de forma exponencial (Ferrer *et al.*, 2019).

Estudios hechos con *Trametes máxima* mostraron un crecimiento máximo a los 12 días en fermentación sumergida; la cepa de *Pleurotus ostreatus* mostró un mejor crecimiento en fermentación en medio sólido. El análisis de la biomasa de los hongos en ambos tipos de fermentaciones mediante la cuantificación de quitina, resultó un método rápido, sensible y confiable, que mostró una impetuosa correlación con la determinación gravimétrica de biomasa como medida directa (Pérez *et al.*, 2017).

## **2.5. Radicales libres y antioxidantes**

En la célula el metabolismo del oxígeno molecular propicia la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por ejemplo, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el radical superóxido, éstos pueden generar toxicidad al ponerse en contacto con macromoléculas celulares. (Ghezzi, *et al.*, 2017). El estrés oxidativo resulta en daño molecular y celular (Tan, 2018); puede conducir a un deterioro

fisiológico y una mayor incidencia de enfermedades y muertes relacionadas con la edad (Buffenstein, *et al.*, 2008). Es por ello que los organismos han desarrollado sistemas para defenderse y poder eliminar las ROS (Ghezzi, *et al.*, 2017).

El estrés oxidativo está relacionado con la inestabilidad genómica como resultado del daño del ADN y la acumulación de enlaces cruzados glicosilados durante el daño de la proteína que puede dar como resultado la patogénesis asociada con la enfermedad cardiovascular y neurodegenerativa. Las ROS son producido endógenamente en condiciones fisiológicas normales; se producen continuamente a lo largo de nuestra vida (Buffenstein, *et al.*, 2008).

La evidencia de investigación emergente ha sugerido que los antioxidantes pueden controlar la auto-oxidación al interrumpir la propagación o inhibir la formación de radicales libres y posteriormente disminuir el estrés oxidativo, mejorar la función inmunológica y aumentar la longevidad saludable (Tan, 2018).

### 3. ANTECEDENTES

Yang *et al.*, (2002) analizaron propiedades antioxidantes de varios hongos comerciales encontrando poderes reductores excelentes, con respecto al efecto eliminador de radicales libres hidroxilo, los hongos ostra de árbol fueron los más altos (54,3%), mientras que otros hongos comerciales fueron bajos. Los fenoles totales fueron los principales componentes antioxidantes naturales encontrados.

Ribeiro *et al.*, (2008) realizaron un estudio comparativo de la composición de ácidos orgánicos y fenólicos y del contenido total de alcaloides de hongos silvestres comestibles enteros (*Russula cyanoxantha*, *Amanita rubescens*, *Suillus granulatus* y *Boletus edulis*), tapas y estípites respectivamente. Todas las especies presentaron ácidos oxálico, cítrico, málico y ácidos fumáricos, *A. rubescens* exhibió el contenido más alto de ácidos orgánicos totales. Los ácidos orgánicos se fijaron preferiblemente en la tapa. Entre los compuestos fenólicos, solo se encontró en cantidades bajas ácido p-hidroxibenzoico en *A. rubescens* y *S. granulatus*, *B. edulis* fue la especie que presentó mayores cantidades totales de alcaloides.

Mares, (2014) determinó componentes antioxidantes en especies de hongos (*Amanita caesarea*, *Hypomyces lactifluorum*, *Ramaria flava*, *Boletus edulis*, *Hericiium erinaceus*, *Tricholoma magnivelare*, *Sparassis crispa* y *Licoperdon perlatum*) encontrando que contienen ácidos fenólicos como: ácido gálico, cafeico, ferúlico y clorogénico.

Ferrer *et al.*, (2019) estudiaron la cinética de producción de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* a partir de la biomasa micelial obtenida mediante fermentación sumergida, después de 72 h observaron que comenzó a crecer la producción de los polifenoles de forma exponencial, momento en el cual se creó una meseta de máxima producción en un tiempo comprendido de 105 a 130 h. Esto debido al descenso de la concentración de glucosa en el medio de cultivo. A las 130 h hubo una disminución brusca en la concentración de fenoles totales y un ligero aumento en la concentración de azúcares reductores.

#### 4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se sabe que al estudiar y conocer la composición química de los hongos silvestres comestibles, en primer lugar, permite validar el aporte nutricional que éstos proporcionan al consumidor, esto debido a que mediante ciertas técnicas se pueden obtener datos sobre el contenido proteico, de humedad y de lípidos, principalmente.

En segundo lugar, mediante el estudio de la composición de los hongos, es posible adquirir conocimiento sobre diversos metabolitos secundarios que generan las especies fúngicas y que son de mucho interés ya que tienen actividad biológica. Entre dichos metabolitos se encuentran los alcaloides, saponinas, cumarinas, quinonas, taninos y flavonoides. De éstos, los compuestos fenólicos son de gran importancia para este trabajo porque están asociados con actividades antioxidantes. Además estudios han revelado que algunos de los compuestos fenólicos presentes en los hongos silvestres comestibles son los flavonoides.

Existen reportes de hongos silvestres comestibles que se han cultivado *in vitro* ya sea por medio de esporas o del mismo cuerpo fructífero, la principal ventaja de lograr este cultivo *in vitro* es que para estudiar a estos hongos ya no se tendrían que recolectar desde su hábitat natural solamente en temporada de lluvias, es decir se podrían tener a disposición para su estudio en todo momento. Un problema de cultivar este hongo *in vitro* sería que no produjera los mismos metabolitos secundarios de interés que se han descubierto en los cuerpos fructíferos.

¿Cuál es la composición química proximal y antioxidante de algunos de los hongos silvestres de San Mateo Río Hondo?

¿Qué tipos de metabolitos secundarios bioactivos producen estos hongos?

¿Qué cambios hay en la capacidad antioxidante de los hongos seleccionados en comparación con el cultivo *in vitro*?

## **5. HIPÓTESIS**

Los hongos silvestres comestibles seleccionados pertenecientes a la comunidad de San Mateo Rio Hondo, Oaxaca, tienen alta actividad antioxidante total y capacidad bloqueadora de radicales libres DPPH debido a un contenido elevado de fenoles totales y flavonoides, así como alto contenido de nutrientes.

## 6. JUSTIFICACIÓN

En San Mateo Rio Hondo, Oaxaca, generalmente en temporada de lluvias, se desarrollan diferentes especies de hongos silvestres comestibles. Resulta de gran importancia analizar el contenido químico proximal que tienen los alimentos cultivados en la naturaleza como son los hongos silvestres comestibles. De esta manera se puede conocer realmente la cantidad de proteínas, lípidos, agua y minerales del objeto de estudio y con ello garantizar que su ingesta tiene ciertamente un aporte nutricional adecuado.

En la actualidad existe escasa información del análisis del contenido químico proximal y antioxidante de muchos alimentos, en especial de los hongos silvestres comestibles provenientes del estado de Oaxaca en comunidades que utilizan estos hongos como parte de una dieta o algún propósito medicinal o nutraceútico, lo cual es preocupante.

Como se describe en el presente, hay una serie de estudios que han revelado que el contenido fenólico se puede correlacionar con actividades antioxidantes y propiedades nutraceuticas. De ahí el creciente interés en los hongos comestibles y el aislamiento e identificación de metabolitos con potencial bioactivo, con ello se logrará un gran aporte a la ciencia que puede servir de consulta para investigadores mexicanos y de todo el mundo.

Con este trabajo se pretende obtener datos que describan la composición químico proximal y antioxidante de los hongos silvestres mayormente consumidos y recolectados en el bosque de San Mateo Rio Hondo, perteneciente a la Sierra Sur del estado de Oaxaca. Con ello se puede agregar valor a dichos hongos comprobando la presencia de estos compuestos de gran relevancia con propiedades medicinales como antioxidantes, anticancerígeno, antibióticas y antitumorales. Además la información puede ofrecer a los pobladores ideas y alternativas del uso responsable para el aprovechamiento de estas especies.

## 7. OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar la composición química proximal y evaluar capacidad antioxidante de hongos silvestres comestibles de San Mateo Río Hondo, Oaxaca.

### Objetivos específicos

- ✓ Conocer el aporte nutricional de hongos silvestres comestibles de San Mateo Río Hondo por medio de un análisis químico proximal.
- ✓ Identificar los metabolitos secundarios de interés como: saponinas, cumarinas, quinonas, taninos y flavonoides para validar las propiedades biológicamente activas de hongos silvestres comestibles de San Mateo Río Hondo.
- ✓ Determinar los compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de hongos silvestres comestibles de San Mateo Río Hondo y del cultivo *in vitro*.
- ✓ Evaluar la capacidad antioxidante de hongos silvestres comestibles de San Mateo Río Hondo y del cultivo *in vitro* a través de las técnicas: actividad antioxidante total y la capacidad bloqueadora de radical libre DPPH.

## 8. METODOLOGÍA

En la figura 8.1, se visualiza el diagrama experimental general para la realización del proyecto.

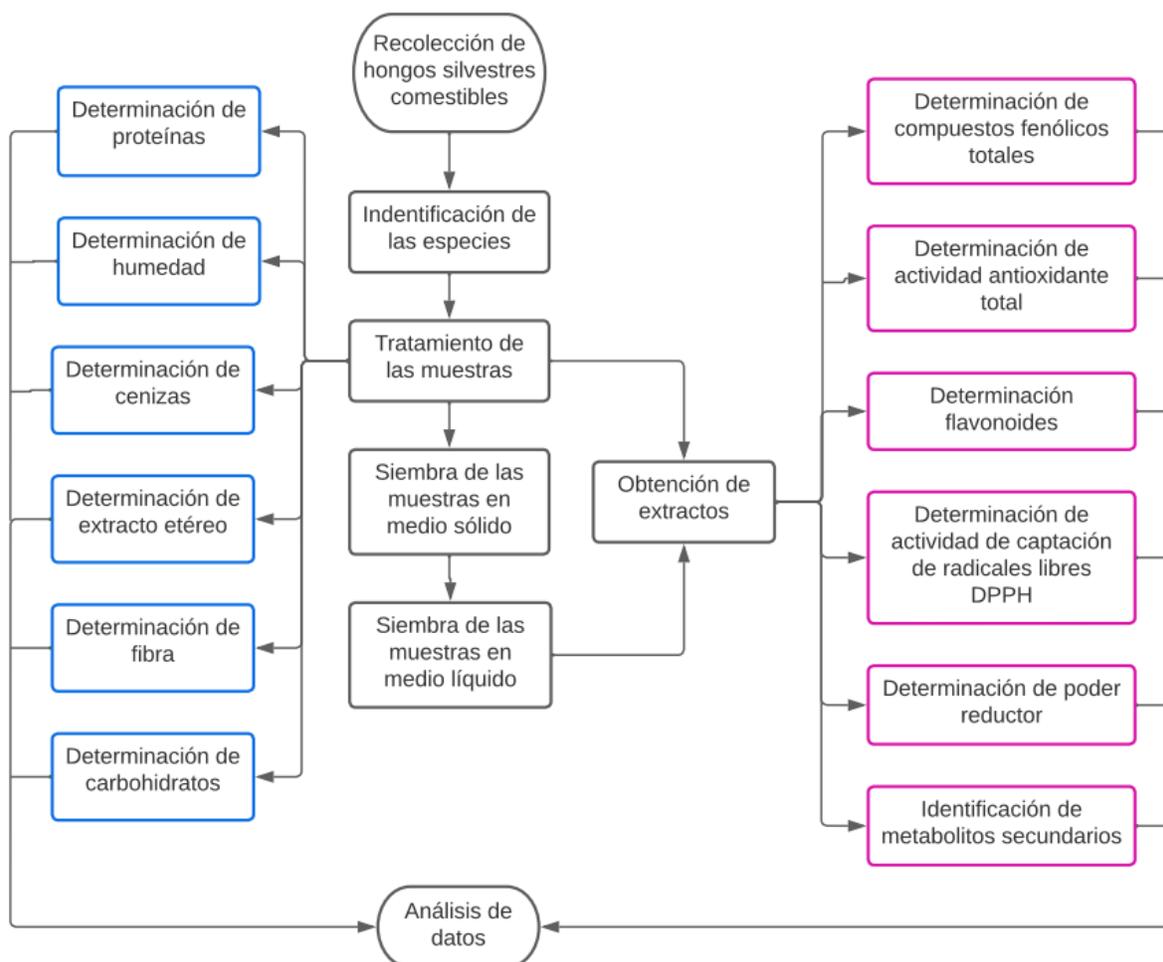


Figura 8.1 Diagrama de flujo para la elaboración del proyecto.

### 8.1. Recolección del material fúngico e identificación de las especies

Los hongos silvestres comestibles se recolectaron en el bosque de San Mateo Rio Hondo, Oaxaca con el acompañamiento de personas de la comunidad y la M. en C. Baleria María Hernández Chávez. Las especies se identificaron por los expertos: Dr. Ricardo Valenzuela Garza y el Biólogo Héctor Aguilar Reyes. *Ganoderma brownii* se

recolectó en noviembre del 2021 y *Ramaria sp.*, *Laccara laccata* e *Hypomyces lactifluorum* en agosto del 2022.

## **8.2. Tratamiento de las muestras**

Se limpió la muestra eliminando residuos sólidos como hojas y polvo. Se pesó, se lavó y se dejó escurrir, posteriormente se congeló una parte de la muestra para posteriormente realizar siembra en medios de cultivo sólido, la otra parte se secó en la estufa a 35-40°C.

## **8.3. Análisis químico proximal**

Este análisis se realizó al hongo comestible silvestre e incluye la determinación de proteínas, extracto etéreo, cenizas, humedad, fibra y carbohidratos.

### **8.3.1. Determinación de proteínas. Determinación de proteínas. Método de Kjeldahl. Basado de en método AOAC 920.87.**

Se taró papel libre de nitrógeno y se pesó 0.8 g de muestra húmeda en balanza analítica. Se añadió la muestra al fondo del matraz Kjeldahl y se agregó 1.5 g de la mezcla de catalizadores y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se colocó en el matraz digestor y se calentó moderadamente al principio y después energicamente. El calentamiento se hizo hasta su completa oxidación, punto donde la mezcla formará una solución verde clara transparente.

**NOTA: Si se agota el ácido y no se ha digerido completamente la muestra (cuando no ha alcanzado el color verde claro transparente), se dejará enfriar, y se añadirá otra pequeña cantidad conocida de ácido y se seguirá calentando.**

Al finalizar la digestión, se enfrió el matraz. Se añadieron 5 ml de agua para disolver toda la muestra, se agitó y enfrió. Se preparó el aparato de destilación. A la salida del refrigerante, se adaptó un matraz Erlenmeyer de 250 ml el cual debe contener de

6 ml de ácido bórico 4% y diez gotas de indicador de Wesselow. A continuación se añadió al matraz Kjeldahl, estratificando lentamente, NaOH 50% hasta que se obtuvo en la muestra un tono café oscuro. Se prendió el equipo y se abrió la llave de agua. Para garantizar que se ha destilado todo el amoníaco se depositaron unas gotas de destilado sobre papel pH, si este indica que el pH es neutro o ácido la destilación ha concluido, de lo contrario se debe continuar destilando. Una vez concluida la destilación, se retiró primero el matraz colector y después se apagó la fuente de calor. Por último se tituló el destilado con solución de HCl de normalidad conocida.

Cálculos:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(V \times N \times pEq \times 100)}{m}$$

Donde:

V: mL de HCl gastados en la titulación del destilado.

N: Normalidad de la solución valorada de HCl.

pEq: Peso equivalente del nitrógeno (14 mg/meq ).

m: miligramos de la muestra pesada

### **8.3.2. Determinación de extracto etéreo. Método de Soxhlet. Basado en el método de la AOAC 920.39.**

El recipiente metálico se llevó a peso constante colocando en la estufa a 100-110 °C. Posteriormente se pesó 2 g de muestra seca, en el cartucho de celulosa y se tapó con algodón. Se adaptó el cartucho al equipo Soxhlet. Después se adicionó 80 ml de éter de petróleo anhidro en el matraz receptor y conectó la fuente de calor. Se mantuvo el reflujo hasta completar la extracción de la grasa. Enseguida se suspendió el calentamiento, se retiró el cartucho sin grasa y el recipiente metálico se dejó secar hasta eliminar el olor a éter. Se llevó a la estufa hasta peso constante a 100- 110 ° C. Finalmente se enfrió en el desecador 15 minutos y se pesó el cartucho. Se repitió el paso anterior hasta peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{P - p}{M} \times 100$$

Donde:

P: Masa en gramos del matraz con grasa

p: Masa en gramos del matraz sin grasa

M: masa en gramos de la muestra.

### 8.3.3. Determinación de cenizas basado en el método AOAC 923.03.

Se llevó a peso constante un crisol, se pesó 2 g de muestra en el crisol. Después se carbonizó la muestra con el mechero, lentamente para evitar perder muestra por arrastre de humo y proyecciones fuera del crisol. Cuando el desprendimiento de humo se cesó, se llevó el crisol a la mufla a una temperatura entre 500-600°C, hasta que las cenizas estuvieron libres de carbón (cuando se observan grises o blancas). En caso de que lo anterior no suceda, se deja enfriar y se agrega unas gotas de agua destilada, se pone a secar de nuevo en el mechero y se continúa calentando hasta peso constante. Posteriormente se transfirió el crisol a la estufa que se encuentra a una temperatura de 100- 110°C, se enfrió y llevó al desecador (10 min). Se pesó la muestra y se repitió los últimos dos pasos hasta obtener un peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Donde:

$m_2$  = Masa en gramos de la cápsula con las cenizas

$m_1$  = Masa en gramos de la cápsula con la muestra

$m_0$  = Masa en gramos de la cápsula vacía

### 8.3.4. Determinación de humedad por el método de estufa (NMX-F-294-SCFI-2011)

Se colocó las cápsulas vacías a peso constante. Se retiraron las cápsulas de la estufa y se colocaron en el deshumidificador (10 min), se pesaron las cápsulas lo más rápido posible con una exactitud  $\pm 1$  mg. Se pesó 10 g de muestra y se pesó la cápsula con la muestra con el contenido (exactitud de 0,1 mg). Volver a colocar las cápsulas en la estufa (80°C). Se secó la muestra durante 24 h, asegurando que no haya otros materiales en la estufa durante este periodo de secado. Se pesó la cápsula con muestra para calcular la pérdida durante el secado. Se retiraron las cápsulas de la estufa y se colocaron en el desecador. Posteriormente se registró el peso final con una exactitud de  $\pm 0,1$  mg.

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P1 - P2}{m} \times 100$$

P1: Peso en gramos del recipiente con la muestra húmeda

P2: Peso en gramos del recipiente con la muestra seca

m: Peso en gramos de la muestra

### **8.3.5. Determinación de fibra según la norma NMX-Y-094-SCFI-2012**

Se pesó entre 1 y 1.5 g de muestra (W1) en los crisoles correspondientes. Después se insertaron los crisoles en la columna verificando los ganchos de seguridad. Se cerraron todas las válvulas y se añadió en las columnas hasta la marca indicadora ácido sulfúrico 0.255 N desde la parte superior utilizando un embudo. Posteriormente se abrió la llave de agua fría del sistema de reflujo y se encendió el equipo. La ebullición permaneció 30 minutos. Pasado el tiempo, se filtró y lavó 3 veces con agua destilada caliente utilizando aproximadamente 50 ml. Se agregó hidróxido de sodio 0.313 N a las columnas de la misma forma que el ácido más 2 o 3 gotas de antiespumante y se llevó a ebullición durante 30 min. Se filtró y se hicieron 3 lavados con agua destilada de la misma manera antes mencionada. Se llevaron los crisoles a la estufa a 130 °C durante una hora, se pasaron al desecador 15 minutos y se

pesaron (W2). Se transfirieron los crisoles a la mufla a 500°C una hora se pasaron al desecador 15 minutos y se pesaron (W3).

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{W2 - W3}{W1} \times 100$$

### 8.3.6. Determinación de carbohidratos

Los carbohidratos son un grupo heterogéneo de compuestos sin ninguna propiedad deiferencial con los otros grupos que permita su análisis. Dicho lo anterior se puede calcular los carbohidratos totales por diferencia como se muestra a continuación (Kuklinski, 2003).

*% Carbohidratos asimilables*

$$= 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ Lípidos} + \% \text{ Fibra})$$

## 8.4. Aislamiento y cultivo *in vitro*

Antes de llevar a cabo la siembra de las muestras en medio de cultivo sólido, se realizó un lavado con agua estéril, hasta la eliminación de impurezas. Después se lavó la muestra con alcohol etílico desnaturalizado comercial al 70 % manteniéndola sumergida durante 1 minuto. Finalmente se enjuagó con agua estéril y se secó sobre papel absorbente.

### 8.4.1. Aislamiento por medio de tejido

Utilizando una navaja se cortó el hongo longitudinalmente. Se tomó fragmentos de 1cm<sup>2</sup> de carne del hongo y se colocaron en el centro de cajas de Petri con medio de cultivo. Para un análisis posterior, las cajas con los respectivos hongos se incubaron entre 25-28°C, en la obscuridad durante los días requeridos. El desarrollo de un color blanco o blanco amarillento indica que el aislamiento se realizó adecuadamente.

#### **8.4.2. Crecimiento en medio líquido**

Se añadió micelio crecido en medio sólido (1 cm<sup>2</sup>) a un Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo líquido esterilizado previamente. Se colocó en una incubadora con agitación constante a una temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### **8.5. Obtención de los extractos**

Para determinar de la actividad antioxidante por medio de las diferentes pruebas y para la identificación de algunos metabolitos secundarios, se obtuvieron extractos etanólicos.

##### **8.5.1. Obtención de extractos a partir del hongo seco**

Se pesó 2 g de material seco en matraces Erlenmeyer de 250 ml (protegidos de la luz) y se extrajo los antioxidantes con 20 ml de etanol al 80%, con agitación, a temperatura ambiente durante 8 h. Posteriormente, se filtró y se utilizó el sobrenadante para la determinación de actividad antioxidante y la identificación de algunos metabolitos secundarios (quinonas, cumarinas, taninos, saponinas, alcaloides, sesquiterpenlactonas y glucósidos cardiotónicos y flavonoides).

##### **8.5.2. Obtención de extractos a partir de la biomasa producida**

Se lavó exhaustivamente con agua destilada la biomasa colectada. Se filtró al vacío el micelio resultante y se llevó a sequedad en una estufa a 35-40 °C. Después se pesó 1 g de biomasa húmeda de cada muestra y se colocaron en tubos de ensayos.

#### **8.6. Evaluación de la actividad antioxidante total**

La actividad antioxidante se analizó por el método descrito por Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999).

### *Preparación de la curva de calibración de ácido ascórbico*

Preparación de la solución madre de ácido ascórbico: Se pesó 5 mg y se disolvió en agua destilada, se enrasó a un volumen de 5 ml para obtener una solución madre con concentración 1mg/1ml (Disolución A). Se añadió a partir de la disolución las siguientes alícuotas: 0, 25, 50, 100, 150 y 200  $\mu$ l y se completaron a 1ml con agua destilada para completar la curva de calibración.

### *Método para la determinación*

Se mezcló 0.3 ml de extracto etanólico con 3 ml de solución reactiva (1 ml de ácido sulfúrico 0.6M, 1 ml de fosfato de sodio 28mM y 1 ml de molibdato de amonio 4mM). Se incubó la mezcla a 95°C por 90 minutos. Se midió la absorbancia a 695 nm. Los resultados se expresan en mg EAA/g de muestra.

## **8.7. Determinación de compuestos fenólicos totales**

Para determinar compuestos fenólicos totales se siguió el método propuesto por Singleton *et al.* (1999). Este método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico), a pH básico, dando lugar a un complejo de color azul susceptible de ser determinado espectrofotométricamente a 765 nm.

Se colocó 40  $\mu$ L de cada extracto (o solución estándar) en tubos de 10 ml; posteriormente, se adicionó 3.2 ml de agua destilada a cada tubo, seguidos de 200  $\mu$ l del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua destilada. Transcurridos de 5 minutos se adicionó 600  $\mu$ l de solución de carbonato de sodio al 10 % y se agitó en un vortex. Las mezclas obtenidas se dejaron en la obscuridad durante 1.5 h para su posterior lectura en un espectrofotómetro a 765 nm. Para realizar la curva de calibración, se preparó una solución stock disolviendo 50 mg de ácido gálico en 5 ml de etanol y diluyendo a 100 ml con agua. Para realizar la curva tipo se tomaron alícuotas de 0, 25, 50, 100, 150 y 200  $\mu$ l de la solución stock en tubos de 5 ml y se

llevó a un volumen de 500 µl con agua destilada. Se debe evitar que las soluciones estén expuestas a la luz. Entonces se procedió como se describió anteriormente. Los resultados se expresan en mg EAG/g de muestra.

### 8.8. Determinación de flavonoides totales

Para determinar el contenido de flavonoides se siguió el método descrito por Ebrahimzadeh *et al.* (2008). Este método está fundamentado en la reacción de los iones aluminio con los flavonoides, en medio alcalino, con la formación de un complejo que absorbe luz a 415 nm.

A 0.5 ml de extracto o solución estándar, se le adicionarán 1.5 ml de etanol, 0.1 ml de AlCl<sub>3</sub> al 10%, 0.1 ml de acetato de potasio 1 M y 2.8 ml de agua. La mezcla se dejó 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro. La concentración de flavonoides, expresado como mg equivalentes de quercetina por 100 g de muestra, se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$\text{Flavonoides (mg EQ/ 100 g)} = (L \times 20 \times 100) / (1000 \times m)$$

Donde:

EQ = equivalentes de quercetina

L = concentración de flavonoides a partir de la curva tipo, en µg/ml

m = peso de la muestra en g

20 = ml de disolvente con que se extrajeron los flavonoides

1000 = conversión de µg a mg

La curva tipo se elaboró a partir de una solución madre de 1 mg/ml de quercetina (100 mg de quercetina disuelta y aforada a 100 ml con etanol).

### 8.9. Método del DPPH

Se basa en la habilidad de los antioxidantes para reducir el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) lo cual se evidencia por la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. Se utilizó el método descrito por Brand Williams *et al.*, (1995).

#### *Preparación de solución*

Se preparó la solución de trabajo disolviendo 0.0025 g de DPPH en 100 ml de etanol (ajustar la lectura a una absorbancia entre 0.8 y 1.0, agregando etanol o DPPH).

#### *Análisis de muestras*

Se mezcló 200 µl del extracto etanólico de las muestras o de Trolox, con 4 ml de la solución de DPPH. Se leyó la absorbancia a 515 nm después de 30 min de haber iniciado la reacción.

Se preparó una curva tipo graficando el porcentaje de inhibición contra concentración de Trolox (150-750 µM). Los resultados se expresarán en µmol equivalentes de Trolox/g de muestra.

$$\% \text{Inhibición} = (\text{Abs control} - \text{Abs muestra}) \times 100 / \text{Abs control}$$

Donde:

Abs control: absorbancia del DPPH sin muestra.

Abs muestra: absorbancia del DPPH después de reaccionar 30 min con la muestra

### 8.10. Evaluación de la reducción de ferrocianuro

El poder reductor se determinó según el método descrito por Babu & Rao (2013) con algunas modificaciones. 150 µL de muestra se mezcló con 1.1 ml de buffer de fosfato (pH 6.6) y 2.5 ml de ferrocianuro de potasio 1%. Después la solución se incubó a 50 °C durante 20 min, se añadió 2.5 ml de ácido tricloroacético al 10%. Se centrifugó a 2800 rpm durante 10 min. Posteriormente 2.5 ml de sobrenadante se mezcló con 2.5

ml de agua desionizada y 0.5 ml de cloruro férrico 0.1%. Por último se midió la absorbancia a 700 nm. Los resultados se expresan en mg EAA/g de muestra.

Se realizó una curva de calibración para calcular la concentración, como estándar se utilizó ácido ascórbico de la misma manera que para la determinación de actividad antioxidante total.

### **8.11. Determinación de la presencia de algunos metabolitos secundarios**

Se ha reportado estudios para verificar la existencia de metabolitos secundarios de interés, aunque estos métodos suelen ser repetitivos en varios estudios, hay algunas variaciones, a continuación se presenta la metodología que se usará en este trabajo, con algunas modificaciones, para la determinación de cada metabolito de interés.

#### **8.11.1. Alcaloides**

La mayoría de los alcaloides tienen la capacidad de producir sales solubles en agua en presencia de ácido clorhídrico diluido. Para lograr identificarlos se puede trabajar con pruebas de precipitación en medio ácido, mediante el uso de sales de metales pesados como el ioduro de potasio (reactivo de Dragendorff) y el ioduro de potasio y mercurio (reactivo de Mayer) (Carvajal *et al.*, 2009). El método que se utilizó fue el siguiente.

A 5 ml de extracto acuoso, se agregó 10 ml de HCl al 10%, se calentó a ebullición durante 5 minutos y posteriormente se enfrió y se filtró. Se colocó 1 ml del filtrado claro y transparente en tubos, además del testigo. Se agregó una gota del reactivo de Drangendrof y la prueba resulta positiva si se forma un precipitado naranja (Fasakin *et al.*, 2017; Bouabid *et al.*, 2018;

#### **8.11.2. Saponinas**

Su estructura es glicosídica cuya aglicona consiste en un núcleo esteroideal o triterpénico lo que les otorga un carácter anfótero que les proporciona la posibilidad de

actuar como tensioactivos. Para detectar saponinas se suele utilizar la prueba de formación de espuma (Carvajal *et al.*, 2009).

Se tomó una fracción del extracto acuoso y se agitó vigorosamente por un periodo de 30 segundos. La formación de espuma persistente durante 3 minutos indica una prueba positiva (Bouabid *et al.*, 2018; Robles-García *et al.*, 2016).

#### **8.11.3. Flavonoides**

Se añadió 5 gotas de hidróxido de sodio al 20% al extracto metanólico, si se obtiene un cambio de coloración amarillo el resultado es positivo (Vázquez & García-Vieyra, 2016).

#### **8.11.4. Taninos**

Son polifenoles que provocan la precipitación de proteínas al unirse a ellas. Se puede utilizar el reactivo de gelatina-sal para su detección. Este reactivo provoca un precipitado blanco en presencia de taninos. Estos precipitados formados como tienen la característica de ser solubles en urea 10 M y producir coloraciones verdes, azules o negras tras la adición de cloruro férrico al 10% en agua (Carvajal *et al.*, 2009).

A 1 ml del extracto se le añadió 2 gotas de cloruro férrico. La prueba es positiva si se logra observar una coloración negra azulada (derivados del ácido pirogálico) o una coloración verde (derivado de la catequina) (Robles-García *et al.*, 2016).

#### **8.11.5. Quinonas**

A 2 ml del extracto, se añadió 0,2 ml de etanol y 0,4 ml de NaOH al 5%. La presencia de quinonas será evidente gracias a un cambio de coloración (rojo-violeta) (Bouabid *et al.*, 2018)

#### **8.11.6. Cumarinas**

Estos derivados de la  $\alpha$ -benzopirona presentan una serie de insaturaciones y pueden identificarse utilizando las reacciones propias para lactonas debido a que su estructura poseen una  $\gamma$ -lactona (Carvajal *et al.*, 2009).

Para su identificación en este trabajo se colocó 100  $\mu$ l de extracto y se adicionó 100  $\mu$ l de NaOH al 10%. La coloración amarilla indicará la presencia de cumarinas (Vázquez & García-Vieyra, 2016).

#### **8.11.7. Glucósidos cardiotónicos**

Su estructura se compone de un núcleo esteroidal glicosilado (2 desoxiazúcares) y una lactona insaturada (Carvajal *et al.*, 2009).

Para identificar estos compuestos se puede utilizar la prueba Keller-Kilani: se disolverá 200 ml de extracto acuoso en 1 mL de agua destilada, se agregó 2 mL de ácido acético glacial y posteriormente se adicionó algunas gotas de cloruro férrico al 5%. Las soluciones se colocaron en tubos de ensayo con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva para glucósidos cardiotónicos si se forma un anillo marrón en la interfaz, al igual que la formación de un anillo violeta debajo del anillo marrón o bien en la fase de ácido acético; un anillo verdoso también podrá formarse gradualmente (Bulugahapitiya, 2013).

#### **8.11.8. Lactonas sesquiterpénicas**

Son terpenos que constan de un esqueleto de 15 átomos de carbono unido a una lactona (Carvajal *et al.*, 2009).

Para determinarlos se utilizará la prueba de Baljet: a 5.0 mL de extracto acuoso se adicionó de 3 a 4 gotas del reactivo de Baljet; un cambio de coloración de naranja a rojo demuestra la presencia de lactonas sesquiterpénicas (García *et al.* 2019).

**8.12. Análisis de datos**

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para cada una de las muestras tomadas en cada variable evaluada. Se realizó una prueba de correlación de Spearman mediante el programa SPSS.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 4 especies de hongos silvestres comestibles provenientes del bosque de San Mateo Rio Hondo (SMRH): *Laccaria laccata*, *Hypomyces lactiflorum*, *Ganoderma brownii* y *Ramaria sp.* Además se incluyó una especie control: *Agaricus bisporus* de la marca “monte blanco” adquirida en un centro comercial. Algunas especies se fotografiaron y se muestran a continuación.



Figura 9.1. *Hypomyces lactiflorum*. Especie recolectada en San Mateo Rio Hondo.



Figura 9.2. *Ramaria sp.* Especie recolectada en San Mateo Rio Hondo.



**Figura 9.3. *Agaricus bisporus*. Especie comercial.**

### 9.1. Resultados del análisis químico proximal

En la tabla 9.1 se pueden observar los valores del contenido nutricional de los hongos estudiados. Los resultados se expresan en base seca. En el caso de *L. laccata* la muestra fue insuficiente para realizar los análisis *por lo que* los valores reportados corresponden a la referencia de Gómez-Flores *et al.* 2019.

**Tabla 9.1. Resultados del análisis químico proximal.**

Especie	DETERMINACIÓN (g/100 g de muestra)				
	<u>Cenizas</u>	<u>Extracto etéreo</u>	<u>Proteína</u>	<u>Fibra</u>	<u>Carbohidratos</u>
<i>L. laccata</i>	12.500	3.8000	15.9000	-	67.8000
<i>H. lactiflorum</i>	0.1272	2.1065	34.8800	51.3820	11.5043
<i>G. brownii</i>	0.1424	1.0000	15.0439	42.7528	41.0609
<i>Ramaria sp.</i>	0.1252	4.2020	35.1048	26.9244	33.6436
<i>A. bisporus</i> (comercial)	0.2499	1.8608	32.4526	27.2096	38.2271

Los hongos se consideran una fuente potencial de muchos nutrientes esenciales y compuestos bioactivos terapéuticos. *A. bisporus* pertenece a la familia de los basidiomicetos y es el hongo cultivado comercialmente más importante del mundo por ello se utilizó como hongo referencia para comparar resultados y utilizarlo como

muestra estándar. Los ricos nutrientes como carbohidratos, proteínas, lípidos, fibras, minerales y vitaminas presentan a este hongo como un famoso alimento saludable.

Los valores obtenidos en análisis químico proximal de este trabajo para el hongo control son similares a los obtenidos por Atila, Owaid., & Shariati, 2021, proteína de 29.14%, carbohidratos de 51.05% y grasas de 1.56%. Otros autores han reportado el contenido de proteína de *A. bisporus* entre 32 y 42 %. En general en los hongos el contenido de grasa o extracto etéreo es muy bajo comparado con el contenido proteico o de carbohidratos; se ha reportado que para *A. bisporus* oscila entre 1.6 y 2.2% (Wani, Bodha & Wani., 2010). El contenido de fibra reportado para esta especie es de 23.26 % (Cano-Estrada & Romero-Bautista., 2016).

Autores analizaron dos especies de *Ramaria* (*Ramaria patagónica* y *Ramaria botrytis*) encontrando valores de proteína entre 18.1 y 12.6%, de grasa entre 0.9 y 3.4%, de cenizas entre 8.6 y 11%, de carbohidratos entre 72.40 y 73 % (Rugolo, M., et al., 2022), para la especie en estudio de este trabajo se encontró un mejor contenido proteico (35.2048%) aunque un contenido de grasa ligeramente mayor (4.2020%), sin embargo el contenido de carbohidratos es mucho menor al reportado para dichas especies. La variación anterior puede deberse a que no es la misma especie, además puede existir un cambio en la composición fisicoquímica en alimentos de acuerdo al estado de maduración en que se encuentren al momento de la determinación, se han reportado estas variaciones en alguno alimentos por ejemplo mango Tommy Atkins (Villamizar-Vargas, Quiceno-Gómez, & Giraldo-Giraldo, 2019) y en el jengibre (Jaimez-Ordaz, et al., 2021).

Los hongos comestibles silvestres estudiados en este trabajo no han sido lo suficientemente reportados como *A. bisporus* por lo que comparar los resultados obtenidos puede no ser posible, es por ello que al obtener una buena referencia se usó dicha especie.

## 9.2. Evaluación antioxidante

En la tabla 9.2 se presentan los datos obtenidos para evaluar la actividad antioxidante: actividad antioxidante total, reducción de ferrocianuro (poder reductor), compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y capacidad bloqueadora de radical libre DPPH.

**Tabla 9.2. Resultados de la evaluación antioxidante**

ESPECIE	Poder reductor (mgEAA/g)	Actividad antioxidante total (mgEAA/g)	Fenoles totales (mgEAG/g)	Flavonoides (mgEQ/g)	DPPH % INHIBICION
<i>L. laccata</i>	58.2317	14.2135	5.8689	4.7084	19.652
<i>H. lactifluorum</i>	39.646	4.3389	5.602	2.7555	1.9771
<i>G. brownii</i>	3.1005	7.5954	2.1982	1.7721	87.7026
<i>Ramaria sp.</i>	33.646	7.9449	8.0088	2.5892	39.8577
<i>A. bisporus</i> (comercial)	5.0893	8.5077	2.9825	1.1761	86.7537

Como se observa en la tabla 9.2, para el caso de *A. bisporus* en el presente trabajo se obtuvo un valor de 2.9825 (mgEAG/g) en la determinación de compuestos fenólicos totales lo que resulta ser un valor menor al reportado por Ramos *et al.*, 2019 quien halló una cantidad de 23.34 mgEAG/g. La concentración de compuestos flavonoides totales resultó ser similar en comparación con otros estudios que reportan valores de 1 mgEQ/g (I. Palacios, *et al.*, 2011), y mucho mayor que 2.173 µg/g para el sombrero y 1.533 µg/g para el pie (Babu & Rao, 2013), sin embargo estos valores pueden verse influenciados por una serie de parámetros como: la maduración del hongo, el lugar de recolección, el tiempo de almacenamiento e incluso el método de extracción de los compuestos antioxidantes.

Se puede observar que en la determinación de DPPH *A. bisporus* tiene un porcentaje de inhibición del 86.7537% lo que concuerda con Elhusseiny *et al.*, 2021 quienes reportaron 83.93% de inhibición con la misma técnica. Los estudios micoquímicos no

han sido suficientes para comparar resultados con los hongos estudiados en este trabajo, sin embargo existen otras especies estudiadas recientemente como *Pleurotus sp.* que es un basidiomiceto de amplia distribución en el mundo, además de ser valioso comercialmente por su aporte nutricional lo es también por sus propiedades medicinales, para esta especie Cardona Pérez, 2023 ha reportado por el método DPPH en extractos a temperatura ambiente, que las muestras secas mostraron una mayor actividad de eliminación de radicales DPPH (29.37-44.53 %), estos valores entran en el intervalo de actividad de eliminación de radicales DPPH encontrado en este trabajo (1.9771- 87.7026%).

Como se observa en la tabla 9.2, para el caso de *G. brownii* los compuestos fenólicos totales fueron 2.1982, dicho valor se considera bajo en comparación con un estudio donde se obtuvo para extractos etanólicos de *G. brownii* un valor más elevado (100.33 mg EAG/g). Sin embargo, en ese trabajo utilizaron cultivos de laboratorio, es decir, no obtuvieron sus extractos directamente de especies recolectadas (Islas-Santillán, et al., 2017). En otro estudio encontraron valores de 46.3 mg EAG/g y de 26.3 mgEQ/g de fenoles y flavonoides totales (Singh *et al.*, 2021).

La capacidad reductora de un compuesto puede servir como indicador significativo de su potencial actividad antioxidante. Los resultados de la actividad antioxidante total y reducción de ferrocianuro revelan que *A. bisporus* está por encima de la especie *G. brownii*. Un autor trabajó las misma técnica aunque no reportó las mismas especies, analizó hongos comestibles del estado de Durango, encontrando valores que oscilan entre 4.19 y 17.91 mgEAA/g para actividad antioxidante y 0.0089 mgEAA/g para reducción de ferrocianuro (Mares, 2014). En otro trabajo se han reportado valores de poder reductor por el método de la reducción de ferrocianuro de 5.47 mg/ml para el sombrero y 7.91 mg/ml para el pie de la especie *A. bisporus* (Babu & Rao., 2013).

En realidad la capacidad antioxidante total es una evaluación que se ha realizado principalmente en plantas medicinales por ejemplo en *Adhatoda vasica* Nees y *Sesbania grandiflora*. La actividad de poder antioxidante y reductor total en *A. vasica* resultó ser de 83,7±1,76 AAE/g y 40,3±0,288 Vit E E/g respectivamente, mientras que

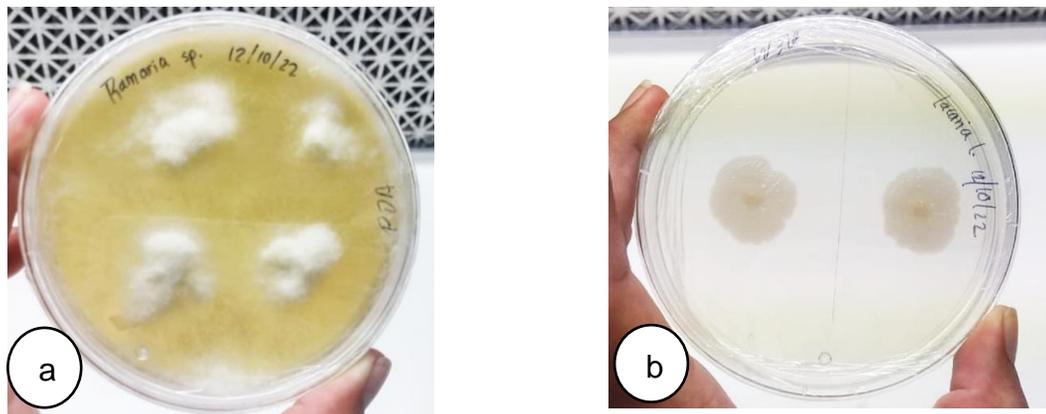
en *S. grandiflora* se encontró que fue de  $46,7 \pm 1,44$  AAE/g y  $35,3 \pm 1,154$  Vit E E/g respectivamente (Padmaja., Sravanthi., & Hemalatha., 2011). Otros autores reportaron disolventes diferentes al etanol en hojas de *Coccinia grandis* encontrando valores de contiene  $31.66 \mu\text{g}$  de vitamina E equivalente/ $100 \mu\text{g}$  en cloroformo (Umamaheswari, & Chatterjee., 2008).

Con los datos de la tabla 9.2 se realizó una prueba estadística de Spearman mediante el programa SPSS.y se obtuvo que los métodos no están correlacionados.

Con base en los resultados presentados en la tabla 9.2, se seleccionaron dos especies de hongos provenientes de San Mateo Rio Hondo, *Laccaria laccata* y *Ramaria sp.* debido a sus propiedades antioxidantes en comparación con las otras especies, además de su excelente composición química proximal que los hace populares como parte de la dieta de la población Oaxaqueña. Estas especies se cultivaron *in vitro*.

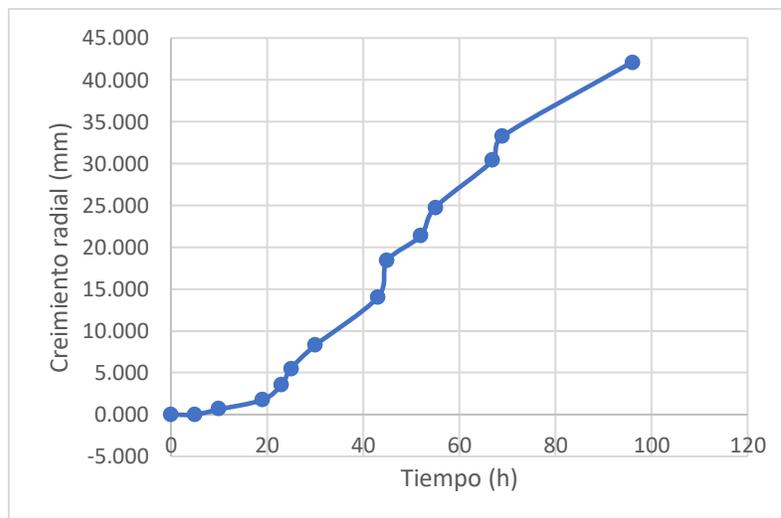
### **9.3. Aislamiento de los hongos seleccionados**

Los hongos se aislaron en dos diferentes medios de cultivo sólido, agar papa dextrosa (PDA) para *Ramaria sp.* y agar extracto de malta (AEM) para *L. laccata*. Una vez aislados se observó su morfología colonial (figura 9.6) donde se distinguen dos diferentes formas. *Ramaria sp.* desarrolló un micelio blanco esponjoso mientras que *L. laccata* desarrolló una crecimiento viscoso blanco.

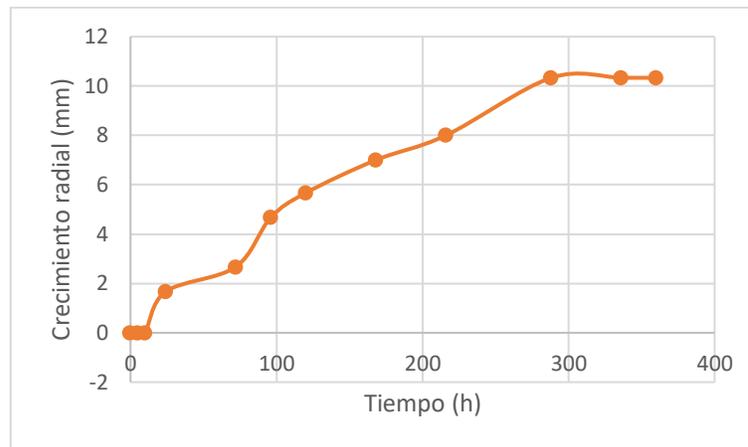


**Figura 9.6. Cultivos in vitro de hongos seleccionados de San Mateo Rio Hondo. a) Ramaria sp. b) L. laccata**

Se midió el crecimiento radial de las especies seleccionadas y que se realizaron las respectivas curvas (figura 9.7 y 9.8). En la figura 9.7 se observa el crecimiento radial de *Ramaria sp.*, esta especie se desarrolló rápidamente, en cuatro días (96 horas) el micelio se expandió por toda la caja Petri y continuó con su desarrollo aéreo. En la figura 9.8 se observa el crecimiento de *L. laccata*, esta especie a comparación de la anterior se desarrolló lentamente, se pudo distinguir la fase de adaptación, la exponencial y la estacionaria.



**Figura 9.7. Curva de crecimiento de *Ramaria sp.***



**Figura 9.8. Curva de crecimiento de *L. laccata*.**

A partir de los cultivos *in vitro* en medio sólido se obtuvieron muestras a los 6 y 12 días para *Ramaria sp.* y a los 6 y 15 días para *L. laccata*. Se realizó la evaluación antioxidante con los cinco métodos propuestos para las cuatro muestras incluyendo el cultivo en medio líquido de cada especie, sin embargo, la prueba del poder reductor resultó inválida por la baja cantidad de antioxidantes de la muestra que impidió la reacción y consecuentemente la cuantificación.

#### 9.4. Identificación de metabolitos secundarios

Como se ha mencionado, los hongos producen y acumulan metabolitos secundarios, los cuales gracias a sus propiedades biológicas suelen tener diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Cepero de García, 2012; Verpoorte & Alfermann, 2000). En la tabla 9.3 se presentan los resultados de las pruebas realizadas para identificar algunos metabolitos secundarios de las dos especies de hongo de SMRH, tanto en extractos de carpóforos como en cultivo *in vitro* además de la especie control. Como se observa, las tres especies estudiadas presentaron contenido de taninos y flavonoides únicamente.

Algunos autores han estudiado la presencia de metabolitos en algunos hongos silvestres consumidos en el estado de Durango (*Amanita caesarea*, *H. lactifluorum*,

*Ramaria flava*, *Boletus edulis*, entre otros), encontrando que la mayoría presentan flavonoides, taninos y glucósidos cardiotónicos (Mares, 2014). Se ha reportado solo la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos en cultivo *in vitro* de *L. laccata* y ausencia de los otros metabolitos también estudiados en este trabajo (Hernández Chávez *et al.*, 2019).

**Tabla 9.3. Metabolitos secundarios de los hongos seleccionados.**

Especie	Alcaloides	Lactonas sesquiterpénicas	Quinonas	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Cumarinas	Glucósidos cardiotónicos
<i>Ramaria sp.</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>L. laccata.</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Ramaria sp. (in vitro)</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>L. laccata (in vitro)</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>A. bisporus.</i> (comercial)	-	-	-	+	-	+	-	-

En cultivos *in vitro* también se ha estudiado la capacidad antioxidante y el contenido de ciertos compuestos bioactivos aunque no recientemente para las especies que se estudiaron en el presente trabajo.

Se reportan los resultados obtenidos con las cuatro técnicas en la tabla 9.4 donde se observa que en el caso de *Ramaria sp.* el cultivo en medio líquido tiene un mayor contenido de fenoles totales, flavonoides y % de inhibición del radical DPPH en

comparación con *L. laccata* que tiene un poder reductor más alto sin embargo es menos de la mitad del poder reductor del extracto crudo de *L. laccata* (Tabla 9.2).

**Tabla 9.4. Evaluación antioxidante de los cultivos *in vitro*.**

<b>CULTIVOS IN VITRO</b>	Actividad antioxidante total (mgEAA/g)	Fenoles totales (mgEAG/g)	Flavonoides (mgEQ/g)	DPPH %INHIBICION
<i>Ramaria sp.</i> (6 días)	2.5345	1.2966	0.7537	2.5812
<i>Ramaria sp.</i> (12 días)	2.9363	0.4926	0.0976	4.7748
<i>Ramaria sp. líq</i> (7 días)	9.1345	1.7216	1.0788	8.7413
<i>L. laccata</i> (6 días)	2.5155	5.6337	3.1953	0.0270
<i>L. laccata</i> (15 días)	4.1762	1.6270	1.2746	0.4176
<i>L. laccata líq</i> (13 días)	18.8489	0.8306	0.3781	0.0270

Los estudios micoquímicos no han sido suficientes para comparar resultados con los hongos estudiados en este trabajo, sin embargo *Pleurotus sp.* ha sido estudiado actualmente, encontrando una actividad de eliminación de radicales DPPH de extractos obtenidos de micelio (0.50-3.06 %) (Cardona Pérez, 2023). En el presente trabajo la actividad de eliminación de radicales DPPH más baja se encontró para *L. laccata* a los 6 días (crecido en medio sólido) y a los 13 días (crecido en medio líquido) que fue de 0.0270 % y la actividad más alta que se registró fue de 8.7413% para *Ramaria sp.* crecida en medio líquido durante 7 días lo que supera por más del doble el porcentaje de inhibición obteniendo para *Pleurotus sp.* (Cardona Pérez, 2023).

## 10. CONCLUSIONES

- En su mayoría, los hongos silvestres comestibles recolectados, están compuestos principalmente por carbohidratos y fibra, seguido de proteína, y tienen muy poca cantidad de grasa, lo que los convierte en un alimento con un excelente contenido nutricional.
- Las especies de hongos silvestres comestibles recolectados en el bosque de San Mateo Rio Hondo que presentaron mayor actividad antioxidante medida por diferentes métodos son *L. laccata* y *Ramaria sp.*
- Las especies de hongos silvestres comestibles *L. laccata* y *Ramaria sp.* mostraron la presencia de flavonoides y taninos en extracto crudo y en cultivo *in vitro* con base en técnicas colorimétricas.
- El cultivo en medio líquido de *Ramaria sp.* resultó tener superior % de inhibición del radical DPPH, concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides.
- Los cultivos *in vitro* de *L. laccata* y *Ramaria sp.* pueden ser utilizados para la producción de metabolitos biológicamente activos.

**REFERENCIAS**

Anusiya, G., Gowthama Prabu, U., Yamini, N. V., Sivarajasekar, N., Rambabu, K., Bharath, G., & Banat, F. (2021). A review of the therapeutic and biological effects of edible and wild mushrooms. *Bioengineered*, 12(2), 11239-11268.

Atila, F., Owaid, M. N., & Shariati, M. A. (2021). The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: a review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 281-286.

Babu, D. R., & Rao, G. N. (2013). Antioxidant properties and electrochemical behavior of cultivated commercial Indian edible mushrooms. *Journal of food science and technology*, 50(2), 301-308.

Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. (2008). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), 3856-3862.

Beltrán Delgado, Y., Morris Quevedo, H., Domínguez, O. D., Batista Corbal, P., & Llauradó Maury, G. (2021). Composición micoquímica y actividad antioxidante de la seta *Pleurotus ostreatus* en diferentes estados de crecimiento. *Acta Biológica Colombiana*, 26(1), 89-98.

Bick, I. R. C., & Panichanun, S. (1991). Homoerythrina and Related Alkaloids. In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (pp. 1-41). Springer, New York, NY.

Boa, E. (2004). Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población, No. 17. FAO, Roma. 161 p.

- Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., Sayah, K., Cherrah, Y., & Faouzi, M. E. A. (2018). Phytochemical screening and in vitro evaluation of alpha amylase, alpha glucosidase and beta galactosidase inhibition by aqueous and organic *Atractylis gummifera* L. extracts. *Plant Science Today*, 5(3), 103-112.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Buffenstein, R., Edrey, Y. H., Yang, T., & Mele, J. (2008). The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age*, 30(2), 99-109.
- Bulugahapitiya, V. P. (2013). Plants based natural products extraction, isolation and phytochemical screening methods (1ra. ed.). Matara, Sri Lanka: Indika Graphics.
- Cano-Estrada, A., & Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 75-80.
- Cárdenas, W. (2017). *Tamizaje fitoquímico, polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante, del hongo comestible (Auricularia aurícula)* (Tesis doctoral)
- Cardona Pérez, D. M. (2023). Evaluación de la actividad antioxidante de *Pleurotus djamor* cultivado en seis combinaciones de sustrato. (Tesis de licenciatura).
- Carvajal Rojas, L., Hata Uribe, Y., Sierra Martínez, N., & Rueda Niño, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia forestal*, 12(1), 161-170.
- Castro Cachinero, F. J., & Vega, A. M. (2017). *Recolección de setas silvestres*. Ediciones Paraninfo, SA.

- Cepero de García, M. C. (2012). *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes.
- Colak, A., Faiz, O., & Sesli, E. (2009). Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry*, 34(1), 25-31.
- Compendio de información geográfica municipal San Mateo Río Hondo, Oaxaca. (2010). INEGI.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., & Bekhradnia, A.R. (2008). Iron quelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *65 African Journal of Biotechnology*, 7, 3188-3192.
- Elhusseiny, S. M., El-Mahdy, T. S., Awad, M. F., Elleboudy, N. S., Farag, M. M., Aboshanab, K. M., & Yassien, M. A. (2021). Antiviral, cytotoxic, and antioxidant activities of three edible agaricomycetes mushrooms: *Pleurotus columbinus*, *Pleurotus sajor-caju*, and *Agaricus bisporus*. *Journal of Fungi*, 7(8), 645.
- Fasakin, O. W., Fajobi, A. O., & Oyedapo, O. O. (2017). Neuroprotective potential of *Aframomum melegueta* extracts on brain of monosodium glutamate-treated wistar albino rats. *Journal of Neuroscience and Behavioral Health*, 9(2), 16-27.
- Ferrer-Romero, J. C., Mas-Diego, S. M., Beltrán-Delgado, Y., Morris-Quevedo, H. J., & Díaz-Fernández, U. (2019). Estudio cinético de la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida. *Revista Cubana de Química*, 31(1), 16-30.
- Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez-Merlo, R., & Mata, G. (2006). Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción. *Instituto de Ecología, AC, Xalapa, México*.
- García-Granados, R. U., Cruz-Sosa, F., Alarcón-Aguilar, F. J., Nieto-Trujillo, A., & Gallegos-Martínez, M. E. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* Banks ex Kőning et Sims de la localidad de

Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. *Polibotánica*, (48), 151-168.

García Rollán, M. (2006). Manual para buscar setas. Ediciones Mundi prensa.

García, V. (1995). Introducción a la Microbiología. San José, CR: EUNED.

Ghezzi, P., Jaquet, V., Marcucci, F., & Schmidt, H. H. (2017). The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *British journal of pharmacology*, 174(12), 1784-1796.

Gómez-Flores, L. D. J., Martínez-Ruiz, N. D. R., Enríquez-Anchondo, I. D., Garza-Ocañas, F., Nájera-Medellín, J. A., & Quiñónez-Martínez, M. (2019). Análisis proximal y de composición mineral de cuatro especies de hongos ectomicorrízicos silvestres de la Sierra Tarahumara de Chihuahua. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22

Gursoy, N., Sarikurkcu, C., Tepe, B., & Solak, M. H. (2010). Evaluation of antioxidant activities of 3 edible mushrooms: *Ramaria flava* (Schaeff.: Fr.) Quél., *Rhizopogon roseolus* (Corda) TM Fries., and *Russula delica* Fr. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 691-696.

Guzmán, G. (2008). Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(3).

Hernández Chávez. B. M., Pérez Santiago A. D., García Montalvo M. A., & Sánchez Medina M. A. (2019). Evaluación fitoquímica del cultivo *in vitro* del hongo *Laccaria laccata*. *Ingeniantes*, 2(2), pp. 86-91.

I. Palacios, M. Lozano, C. Moro, M. d'Arrigo, M. A. Rostagno, et al.. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128 (3), pp.674-678.

- Islas-Santillán, M. Á., Castañeda Ovando, A., Álvarez Delgadillo, A., Valenzuela Garza, R., Romero-Bautista, L., & Torres-Valencia, J. M. (2017). Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. *Revista mexicana de micología*, 46, 37-45.
- Jaimez-Ordaz, J., Contreras-López, E., González-Mesillas, F., González-Olivares, L. G., Onofre-Sánchez, J. E., & Ramírez-Godínez, J. (2021). Caracterización física y química de *Zingiber officinale* en diferentes estados de maduración para su uso potencial en la elaboración de bebidas saludables. *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI*, 9(17), 82-87.
- Jiménez, Ruiz, M., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., & Torres-Aquino, M. (2013). Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en Valles Centrales, Oaxaca. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(2), 199-213.
- Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., & Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 378-385.
- Kuklinski, C. (2003). *Nutrición y bromatología*. Omega.
- Lang, A. L. A. (2000). *Ecología química*. Plaza y Valdes.
- Lechner, B. E., Rugolo, M., & Mallerman, J. (2018). *Hongos comestibles: El cultivo de *Flammulina velutipes* (enokitake)*. Eudeba.
- López, J. M. S., Saldaña, M. C. M., Camacho, R. R., Morales, R. M. C., Cardoso, M. L. S., & Lara, F. G. (2017). Capacidad antioxidante y caracterización fitoquímica de extractos etanólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) crudo y cocido. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(3), 37-47.

Mares, Quiñones, M. D. (2014). Análisis de componentes antioxidantes en hongos silvestres comestibles consumidos en el salto, pueblo nuevo, Durango (Doctoral dissertation)

Mello, J. P. C., Santos, S. C. (2001). Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed.

Miralles, Bellver, L. (2005). agentes medioambientales. Mad. S. L. Sevilla España.

Mwangi, R. W., Macharia, J. M., Wagara, I. N., & Bence, R. L. (2022). The antioxidant potential of different edible and medicinal mushrooms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147, 112621.

Padmaja, M., Sravanthi, M., & Hemalatha, K. P. J. (2011). Evaluation of antioxidant activity of two Indian medicinal plants. *Journal of phytology*, 3(3).

Pérez, S. R., Arone, M. C., Calzadillo, J. S., Rodríguez, I. A., & Díaz, M. S. (2017). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *Afinidad*, 74(577).

Plazas Gonzalez, E. A. (2017). Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana in vitro de extractos y fracciones de tres especies colombianas del género *Hypericum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 0-0.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.

Ramos, M., Burgos, N., Barnard, A., Evans, G., Preece, J., Graz, M., ... & Jiménez, A. (2019). *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. *Food chemistry*, 292, 176-187.

Rathee, S., Rathee, D., Rathee, D., Kumar, V., & Rathee, P. (2012). Mushrooms as therapeutic agents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 459-474.

- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Gonçalves, R. F., Baptista, P., & Quelhas, I. (2008). Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food chemistry*, 110(1), 47-56.
- Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Robaszkiewicz, A., Bartosz, G., Ławrynowicz, M., & Soszyński, M. (2010). The Role of Polyphenols,  $\beta$ -Carotene, and Lycopene in the Antioxidative Action of the Extracts of Dried, Edible Mushrooms. *Journal of nutrition and metabolism*, 2010.
- Roberts, M. F. (Ed.). (2013). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.
- Robles-García, M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri pittier*)/qualitative identification of secondary metabolites and cytotoxicity determination of tempisque extracts (*Sid. Biotecnia*, 18(3), 3-8.
- Rugolo, M., Mascoloti Spréa, R., Dias, M. I., Pires, T. C., Añibarro-Ortega, M., Barroetaveña, C., ... & Barros, L. (2022). Nutritional composition and bioactive properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* Patagonian forests. *Foods*, 11(21), 3516.
- Singh, R., Shri, R., Singh, A. P., & Dhingra, G. S. (2021). Valorization of Ganoderma Species: Chemical Characterization and Antidepressant-Like Activity. *Waste and Biomass Valorization*, 12(4), 2025-2036.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178

- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P. P., & Sulaiman Rahman, H. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1162.
- Tang, Y. J., Zhu, L. W., Li, H. M., & Li, D. S. (2007). Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors--Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technology & Biotechnology*, 45(3).
- Umamaheswari, M., & Chatterjee, T. K. (2008). In vitro antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(1), 61-73.
- Vázquez, J. F., & García-Vieyra, M. I. (2016). Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de extractos de pitahaya *Hylocereus undatus*. *Jóvenes en la ciencia*, 2(1), 29-33.
- Verpoorte, R., & Alfermann, A. W. (Eds.). (2000). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media.
- Villamizar-Vargas, R., Quiceno-Gómez, C., & Giraldo-Giraldo, G. (2019). Cambios fisicoquímicos durante la maduración del mango Tommy Atkins en la poscosecha. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 22(1).
- Wani, B. A., Bodha, R. H., & Wani, A. H. (2010). Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2598-2604.
- Yang, J. H., Lin, H. C., & Mau, J. L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food chemistry*, 77(2), 229-235.