



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Identificación de compuestos de importancia biológica presentes en hongos silvestres del volcán La Malinche

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

María Isabel Torres García

Codirectoras

Dra. Miriam Ahuactzin Pérez

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2021



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Identificación de compuestos de importancia biológica presentes en hongos
silvestres del volcán La Malinche

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

María Isabel Torres García

Comité Tutorial

Dra. Miriam Ahuactzin Pérez

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. César Augusto Barrales Cortés

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2021

HOJA DE FINANCIAMIENTO

El presente proyecto de tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del apoyo recibido en la beca CONACYT (1011584) en la Maestría en Ciencias Biológicas registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, Padrón Nacional de Posgrado; realizada en las inmediaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

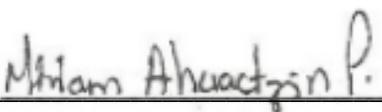
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que María Isabel Torres García realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “Identificación de compuestos de importancia biológica presentes en hongos silvestres del volcán La Malinche”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., OCTUBRE 19 DE 2021



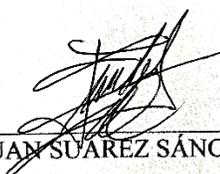
DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



DRA. MIRIAM AHUACTZIN PÉREZ



DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA



DR. JUAN SUÁREZ SÁNCHEZ
DR. JUAN SUAREZ SANCHEZ



M.EN C. GEORGINA PÉREZ MONTIEL

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis inscrita en su programa de estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme la beca de maestría durante los dos años de desarrollo de mi proyecto.

A los miembros de comité tutorial por guiarme, brindarme la atención, el apoyo y el conocimiento para poder culminar con este proyecto.

Agradezco a mis codirectoras, a la doctora Miriam Ahuactzin Pérez y a la doctora Leticia Nicolás Toledo por la oportunidad de poder realizar este proyecto y todo el apoyo incondicional.

De la misma manera agradezco a mis tutores, a la doctora Estela Cuevas Romero y al doctor César Augusto Barrales Cortés por el apoyo que me brindaron siempre.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Laboratorio de Biología Experimental Por la oportunidad que me brindaron para realizar el proyecto de tesis. Gracias infinitas.

A la Dra. Miriam Ahuactzin Pérez Por toda la paciencia y apoyo que me brindó en toda la maestría, gracias por todo el conocimiento y todas las enseñanzas tanto laborales como personales, gracias por ser mi amiga y por la confianza para realizar su proyecto. La quiero mucho.

A la Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo Por todo el apoyo tanto laboral como personal, por recibirme como integrante de su laboratorio y apoyarme incondicionalmente, muchas gracias por el excelente trato y todo el conocimiento que siempre estuvo dispuesta a compartir. Por abrirme las puertas de su cálido hogar, gracias infinitas.

A la M. en B. Guadalupe Águila Por el apoyo incondicional que siempre me brindo, por todo el conomimiento y la amistad, muchas gracias.

Al Laboratorio de Productos Naturales Mesa ¾ Por todo el apoyo, la amabilidad y la cooperación laboral.

A Mis Sinodales Por toda la confianza que me brindan y el apoyo incondicional que siempre están dispuestos a dar.

A Mis Profesores Por todo el conocimiento y las enseñanzas que me regalaron.

A Mi Persona, mil gracias por seguir acompañándome en este viaje, gracias por compartir conmigo esta bonita experiencia. Por abrazarme cuando estoy rota, animarme cuando estoy triste, por festejar conmigo sin tener nada que festejar, por siempre respaldarme y jamás, jamás

abandonarme, gracias por la lokera, las lágrimas secundadas, las horas felices y los ataques de posesión que nos suelen dar, por todas las historias que no podemos escribir, pero siempre nos gusta imaginar, pero en especial, MUCHAS GRACIAS por ser mi mejor amiga. Marci, nunca te voy de mi vida.

A Mis Amigos que siempre están conmigo incondicionalmente, en especial a Ismael, Mitzi, Julio, Icela, Michel, Bris y todas las personas que se incorporaron en mi vida durante este proceso, mucha gracias.

DEDICATORIA

A DIOS Por darme la oportunidad de concluir esta etapa, por jamás permitirme perder la fe y renovarla a cada paso de mi existir.

A DERECK YAEL TORRES GARCÍA Por ser el primer motor de mi vida y regalarme la gran dicha de tenerlo entre mis brazos, todos mis triunfos siempre son pensados en ti. Gracias por cambiar mi mundo. ¡TE AMO POR SIEMPRE!

A EMIR RAMÍREZ TORRES Por ser el principal motor de todo mi existir, eres lo mejor que tengo en mi vida, te amo al infinito y más allá, espero y las huellas tan pequeñas que voy dejando te sirvan para ser EL MEJOR DEL MUNDO, supérate y llega muy lejos mi amor, sueña en grande que yo siempre voy a estar detrás de ti para levantarte si caes.

¡TE AMO HOY, MAÑANA Y SIEMPRE!

A JONALENN DE LA RIVA TORRES Hermosa, espero que siempre seas feliz a pesar de todo, que jamás permitas que alguien te doblegue y te vuelva sumisa, se una fuerza de la naturaleza, rebelde, autentica, brillante y única, siempre contaras conmigo.

¡TE AMO MUCHISIMO!

A MIS PADRES

Papá, nuevamente gracias por todo el apoyo que siempre me das, por nunca dejarme sola, por comprenderme, por tu amor y paciencia, por siempre estar orgulloso de mí, por nunca doblarte cuando todo se desmorona y por ser el mejor padre del mundo, gracias por este otro empujón y por todos los que faltan ¡TE AMO!

Mamá, a ti mis infinitas gracias, no tengo nada para pagarte TODO lo que haces por mí, por estar cuando más te necesito, por siempre pensar en mí antes que en ti, por todos los sacrificios que haces día a día, por luchar aún en contra de la corriente, por darme la vida, porque en este nuevo proyecto siempre me impulsaste a seguir y no parar, por eso y muchas, muchas cosas más. ¡TE AMO INFINITAMENTE!

A MIS HERMANOS

Betty, por ser mi amiga, por la paciencia y confianza que siempre me brindas, por la protección y la comprensión que siempre estas dispuesta a dar, porque a pesar de las adversidades, das amor sin importar nada, por todo el apoyo que me das, y por darme el mejor regalo del mundo ¡TE AMO MUCHO GORDA!

Wuicho, gracias por tenerme tanta paciencia por siempre apoyarme aún en contra de mi rebeldía, por jamás tirar la toalla y ayudarme cuando más lo necesito, por ser mi mejor amigo, confidente, tutor, maestro y todo lo que se pueda imaginar, gracias por formarme académica y personalmente, todo lo que soy te lo debo a ti. Seguimos en el camino, nunca me abandones. Gracias por el camino que forjas pesando en mí. ¡TE AMO SIEMPRE!

LOS AMO, GRACIAS POR TODO

RESUMEN

En el Estado de Tlaxcala, específicamente en el volcán La Malinche existe una gran diversidad de hongos silvestres comestibles, que forma parte de la dieta regional y de la economía de las comunidades aledañas al volcán. Pocos estudios reportan los beneficios nutracéuticos que los hongos silvestres comestibles proporcionan al cuerpo humano ya que son ricos en compuestos que ayudan al adecuado funcionamiento del organismo como los compuestos fenólicos que presentan actividad antioxidante. La importancia de medir esta actividad es que los antioxidantes tienen la capacidad de atrapar o estabilizar moléculas conocidas como radicales libres o especies reactivas de oxígeno, las cuales, en sobreproducción producen un estrés oxidativo en las células ocasionando daño en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El objetivo de este trabajo fue determinar los compuestos de los extractos de hongos silvestres comestibles del volcán La Malinche y su actividad antioxidante. Para ello, se realizó una extracción por maceración utilizando como disolventes metanol y etanol de los hongos *Russula delica*, *Boletus edulis*, *Turbinellus floccosus*, *Amanita rubescens* y *Pholiota lenta*, se hizo un perfil micoquímico empleando cromatografías en capa fina (TLC) utilizando dos fases móviles; DCM-MeOH (95:5) y AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2) observadas con luz UV a una intensidad de onda de 254 nm y 365 nm, aplicamos un revelado colorimétrico con métodos de detección afines a las principales familias de compuestos presentes en los extractos y pruebas colorimétricas para la cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu al 1 N, polifenoles por el método Folin-Ciocalteu al 2 N y flavonoides por el método etanol/acetato de potasio. La concentración necesaria para obtener el IC₅₀ de la actividad antioxidante se obtuvo por el método DPPH. Se empleó una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HP-LC) para conocer cuántos compuestos fenólicos aproximadamente se encuentran presentes en cada extracto. Como resultados se obtuvo que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo en el extracto metanólico de *P. lenta*, en comparación con los otros extractos.

La TLC fase móvil: AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2) mostró mejor arrastre de compuestos, se observó la presencia de compuestos de baja, media y alta polaridad en comparación con la TLC fase móvil DCM-MeOH (95:5), que solo muestra compuestos de media y alta polaridad.

Los hongos *T. floccosus*, *A. rubescens* y *P. lenta* en ambos disolventes presentaron mayor actividad antioxidante en ambas TLC. Sin embargo, la presencia de compuestos resulta mejor cuando son extraídos con metanol. A mayor concentración de fenoles totales, flavonoides y polifenoles se obtuvo en extracto metanólico de *B. edulis*, la concentración de flavonoides el extracto de *B. edulis* no presentó diferencias en comparación con el extracto etanólico de *T. floccosus*. Todos los extractos presentaron actividad antioxidante, las concentraciones mínimas para inhibir o estabilizar el 50% del radical DPPH se obtuvieron en los extractos metanólicos de todas las especies de hongos en comparación con los extractos etanólicos.

El extracto metanólico de *B. edulis* mostró el mejor resultado con respecto a la actividad antioxidante ya que se obtuvo la IC50 a una concentración de 1152 mg/L de extracto, se puede sugerir que esta característica está directamente relacionada con la concentración de compuestos fenólicos, ya que dicho extracto en las tres pruebas colorimétricas presenta la mayor concentración de fenoles totales, flavonoides y polifenoles.

Con respecto a los cromatogramas, todos los extractos mostraron la presencia de compuestos pertenecientes al grupo de los fenoles, teniendo al extracto etanólico de *B. edulis* con la mayor diversidad de estos compuestos, sin embargo, el extracto metanólico de la misma especie no difiere en gran cantidad con el extracto etanólico.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Características generales de los hongos.....	1
1.2.	Descripción de las especies de hongos.....	6
1.2.1.	<i>Russula delica</i>	6
1.2.2.	<i>Boletus edulis</i>	7
1.2.3.	<i>Turbinellus floccosus</i>	9
1.2.4.	<i>Amanita rubescens</i>	10
1.2.5.	<i>Pholiota lenta</i>	12
1.3.	Conocimiento tradicional de los hongos.....	13
1.4.	Importancia medicinal de los hongos.....	14
1.5.	Composición química y valor nutricional.....	15
1.5.5.	Compuestos fenólicos.....	20
1.5.6.	Flavonoides.....	21
1.5.7.	Polifenoles.....	22
1.6.	Estrés oxidativo.....	23
1.7.	Actividad antioxidante.....	24
1.8.	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos.....	25
1.8.1.	Técnicas analíticas cualitativas.....	25
1.8.2.	Técnicas analíticas cuantitativas.....	26
2.	ANTECEDENTES.....	30
3.	JUSTIFICACIÓN.....	31
4.	HIPÓTESIS.....	32
5.	OBJETIVOS.....	32
5.1.	Objetivo general.....	32
5.2.	Objetivos específicos.....	32
6.	METODOLOGÍA.....	33
6.1.	Colecta de los hongos.....	33

6.2.	Obtención de los extractos.....	34
6.3.	Análisis cualitativo de los extractos.....	35
6.3.1.	Cromatografía en capa fina.....	35
7	RESULTADOS	39
7.1	TLC con fase móvil DCM MeOH (95:5)	41
7.1.1	TLC con revelador colorimétrico para compuestos fenólicos.....	42
7.1.2	TLC con revelador colorimétrico para flavonoides.....	42
7.1.3	TLC con revelador para actividad antioxidante	43
7.1.4	TLC con revelador para terpenos, isoprenoides y saponinas	44
7.1.5	TLC con revelador para otros compuestos	46
7.2	TLC con fase móvil Acetato de etilo (AcOEt), Agua (H ₂ O), Metanol (MeOH) y Heptano (16:1:3:2).....	47
7.2.1	TLC con revelador para compuestos fenólicos	48
7.2.2	TLC con revelador para actividad antioxidante	49
7.2.3	TLC con revelador para otros compuestos	50
7.3	Análisis colorimétrico.....	51
7.5.1	Cromatografías de extractos metanólicos y etanólicos con una longitud de onda de 230 nm.....	61
7.5.2	Cromatografías de extractos metanólicos y etanólicos con una longitud de onda de 253 nm.....	66
7.5.3	Cromatografías de extractos metanólicos y etanólicos con una longitud de onda de 290 nm.....	70
8.	DISCUSIÓN.....	74
8.1.	Extracción de compuestos bioactivos.....	74
8.2.	Identificación de compuestos bioactivos.....	75
9.	CONCLUSIONES.....	77
11.	REFERENCIAS	78

1. INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional La Malinche forma parte de los principales cuerpos volcánicos de la Cordillera Volcánica Transmexicana. Éste se localiza entre los Estados de Tlaxcala y Puebla, con una extensión de 1,326 Km², entre los paralelos 19° 06´ 30´´ - 19° 20´ 19´´ latitud norte y los 97° 55´ 32´´ - 98° 09´ 55´´ de longitud oeste, con intervalo altitudinal que va de 2,300 msnm, hasta los 4,460 msnm (INEGI, 2006). Los tipos de vegetación presentes en la montaña son: bosques de *Quercus*, bosque de *Pinus*, bosque mixto de *Pinus-Quercus*, bosques de *Alnus*, bosques de *Pinus hartweggi*, bosque de *Abies*, zacatonal de la montaña, además de áreas destinadas a la agricultura de temporal y agricultura de riego (Villers y cols. 2006). En la mayor parte de la superficie del Parque Nacional La Malinche, el suelo es de tipo andosol vítrico, en las partes más altas se presenta el litosol y en las partes altas de algunas barrancas o cañadas se encuentra regosol (INEGI, 1987). Los bosques con clima templado son el hogar de una gran diversidad de hongos con un registro de más de 93 especies útiles que forman parte de economía local (Montoya y cols. 20004).

1.1. Características generales de los hongos

El reino Fungi se conforma por organismos unicelulares y pluricelulares, que se constituyen por largas y ramificadas hifas (Fig. 1) que se entrelazan para formar el micelio; estructura vegetativa de los hongos. Este consta de una masa de citoplasma multinucleado, encerrado dentro de un sistema de tubos rígidos de diámetro uniforme que surge después de la germinación de la célula productora o espora. Dichos tubos se ramifican rápidamente a medida que se van alargando (Méndez y Monge 2007), si éstos presentan septos se conocen como tabicados o septados y si carecen de ellos, se conocen como cenocíticos (Carrillo 2003). Su pared celular consta principalmente de polisacáridos como la quitina, complejos de quitina-glicanos y glicoproteínas. La nutrición de estos organismos es heterótrofa por absorción (Méndez y Monge 2007).

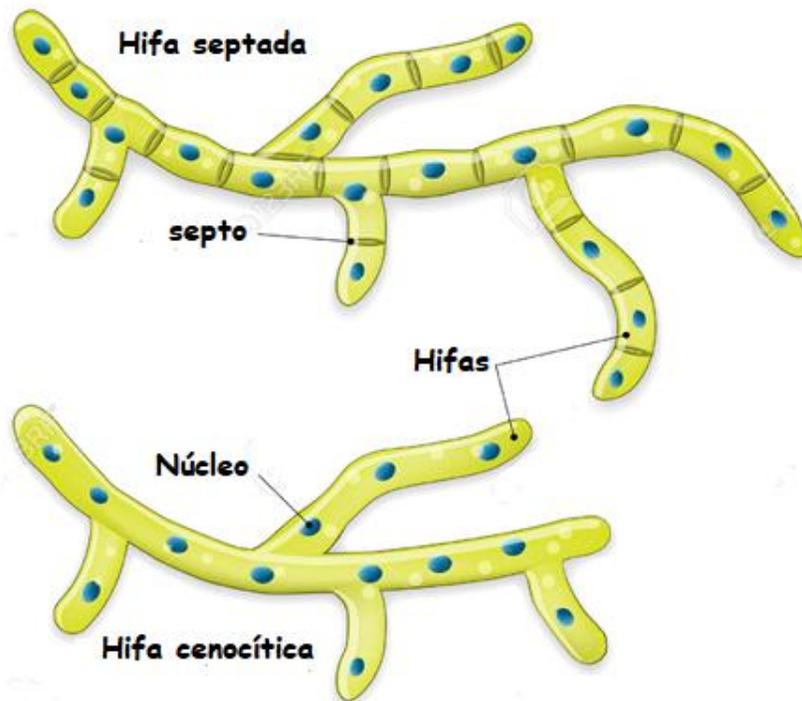


Figura 1. Estructura básica de una hifa septada y cenocítica (Carillo 2003).

Los hongos pueden reproducirse de forma asexual en donde no hay intervención de gametos (Sobrado y cols. 2013). Esta consiste en la producción de nuevos organismos genéticamente iguales al organismo del que se originan, se pueden dar de cuatro formas; por fragmentación del talo o cuerpo del hongo, por división de células somáticas en células hijas, a partir de una célula somática “clamidospora” o por formación de esporas que se producen sobre hifas modificadas “conidióforos” (Hilje y cols. 1991).

La reproducción sexual comienza cuando las basidiósporas haploides de distinta polaridad son liberadas de un basidio maduro en un medio adecuado (Fig. 2), germinan y originan un micelio primario haploide con células uninucleadas. Una vez que el micelio encuentra otro compatible, por medio de plasmogamia, se origina una célula de dos núcleos no fisionados, que se seguirán dividiendo de manera conjugada, para extender al micelio y formar un secundario o dicariótico. El micelio secundario se desarrolla y forma el cuerpo fructífero llamado basidiocarpo,

constituido por basidios que son estructuras reproductivas con dos núcleos (Sobrado y cols. 2013).

Se le denomina macromiceto a los hongos que producen cuerpos fructíferos, reproductores o carpóforos mayores de 1 mm de longitud (Guzmán y cols. 2009). Para los hongos pertenecientes al filum Ascomicota estos cuerpos fructíferos se les conoce como ascocarpo o ascostroma a

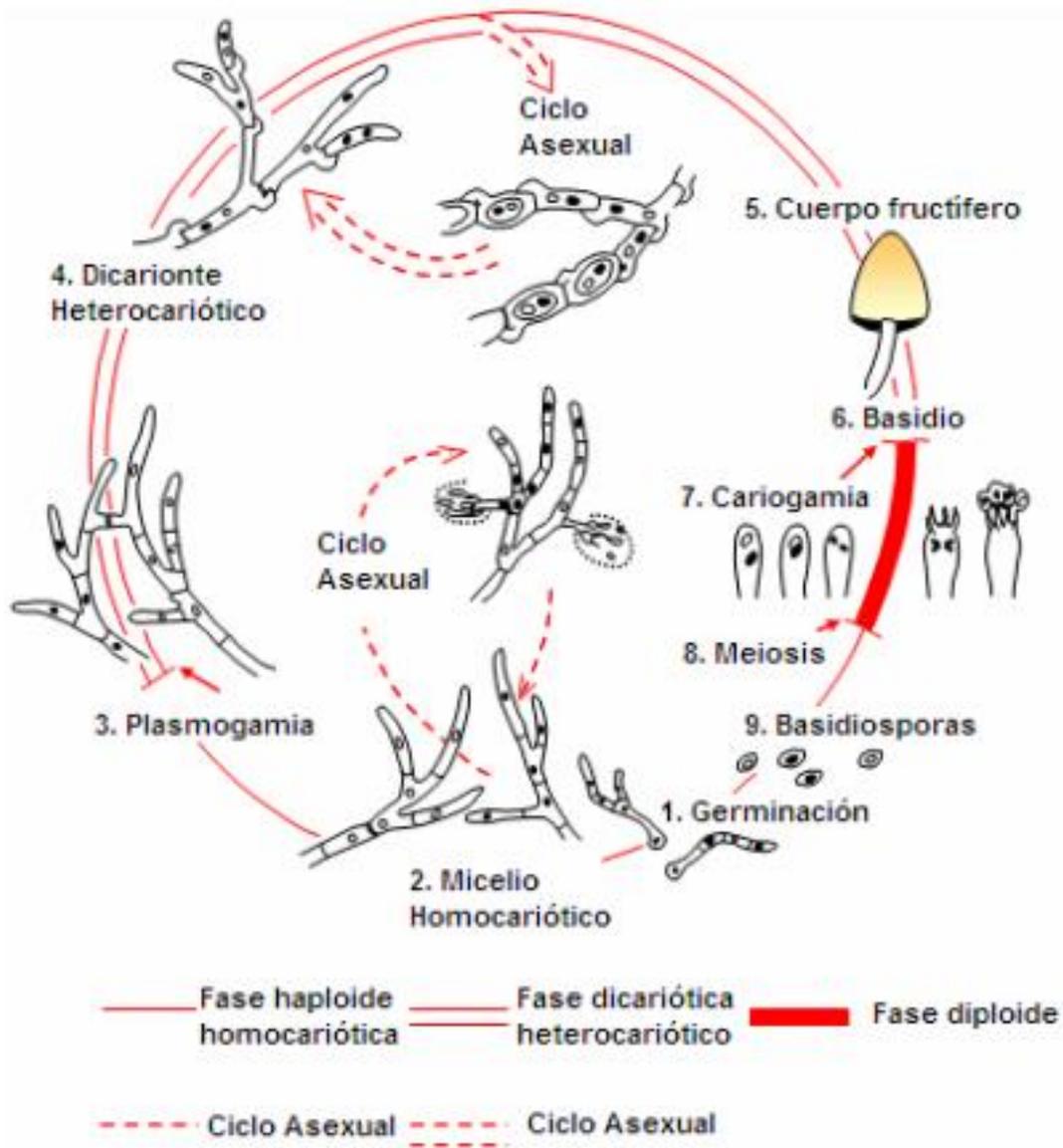


Figura 2. Ciclo reproductivo de los hongos basidiomicetos (Ramírez-Anguiano 2009).

diferencia de los hongos pertenecientes al filum Basidiomycota a los cuales se les conoce como basidiocarpo o basidioma (Cabarro y cols. 2012). Los hongos basidiomicetos se caracterizan por producir esporas (basidiosporas) externas en células llamadas basidios (López y cols. 2011), son el resultado de la plasmogamia, cariogamia y meiosis. Los últimos dos procesos se realizan en el basidio y en cada uno de ellos se producen cuatro basidiosporas, la mayoría de estos hongos producen un micelio septado bien desarrollado (Díaz-Barriga 1992).

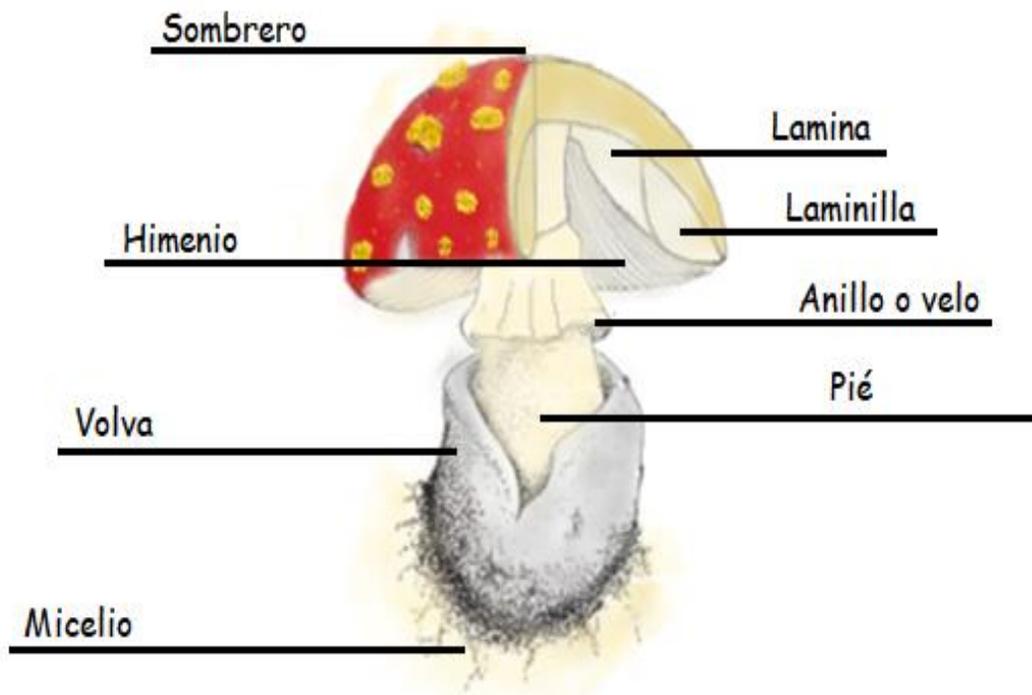


Figura 3. Estructura básica de un hongo basidiomiceto (Modificado de Díaz-Barriga 1992).

Este filum presenta una gran diversidad de formas, colores, ornamentaciones y un aspecto típico característico de un hongo (Fig. 3), presentan sombrero, laminas y pie definido, aunque existen algunos grupos taxonómicos que varían en morfología ya que, en lugar de presentar láminas en el himenio, estos presentan tubos, dientes, poros o venas cuya función es la producción de basidios y basidiosporas (García y cols. 2005).

La diversidad de los hongos va desde su morfología, al sustrato en el que se desarrollan o el grupo trófico al que pertenecen.

Por la diversidad de sustratos en los que se pueden desarrollar se encuentran; los hongos terrícolas que viven sobre tierra, siendo propios de taludes y bordes de caminos (Sánchez 2015). Los humícolas comparten el sustrato con los terrícolas, con la diferencia que estos se encargan de descomponer la materia orgánica que se encuentra en la superficie del suelo reciclando nutrientes provenientes de plantas, animales, hongos y microorganismos muertos (Franco y cols. 2005). Los hongos lignícolas crecen sobre troncos o ramas, iniciando la descomposición de celulosa y lignina provocando una podredumbre blanca, o bien, una descomposición solo de celulosa originando una podredumbre roja (García 2004). Los hongos fimícolas crecen sobre el excremento de los animales, encargándose de la degradación y absorción de nutrientes para integrarlos al suelo (Calonge 2009). A los hongos que desarrollan su micelio en las inervaciones de las hojas se les conoce como folícolas y los hongos corticícolas son organismos que fructifican sobre la madera de árboles vivos en distintas vegetaciones, pueden ser especialistas o generalistas (Moreno y cols. 2010). Los hongos pirófilos están especialmente adaptados a desarrollarse sobre sustratos quemados, carboneras, restos de hogueras, o en suelos donde se ha producido un incendio forestal. También se conocen como hongos carbonícolas y comúnmente son precedidos por hierbas o musgos (Eyssartier y cols. 2011). Los hongos pratícolas se desarrollan sobre la hierba o entre los musgos (Franco y cols. 2005).

Por el grupo trófico al que pertenecen, se agrupan en; saprobiontes o saprófitos, encargados de descomponer la materia inerte animal o vegetal, como madera en descomposición, hojarasca, humus, estiércol y residuos agroindustriales (Álvarez 2006), su principal función en el ecosistema es reciclar y mineralizar los nutrientes (López y cols. 2006). Los hongos parásitos viven a expensas de otros organismos como plantas, animales y hongos (Mata y cols. 2003). En el grupo de los simbioses encontramos dos tipos, los que forman líquenes; estos están formados por hongos y algas (Cabrera y Giacobone 2010) y los que forman micorrizas. Estos son asociaciones entre hongos y plantas (López y cols. 2006).

1.2. Descripción de las especies de hongos

1.2.1. *Russula delica*

Características macroscópicas

Píleo: puede llegar a tener un tamaño de 8 a 20 cm de diámetro, al principio convexo con una depresión central, evolucionando rápidamente a embudado.

Cutícula: es de color blanco crema, con tonos y manchas ocre-amarillentas más evidentes en ejemplares maduros, es seca fina, mate, difícilmente separable de la carne, lisa de joven y rugosa de adulta.

Su margen: está muy enrollado, algo lobulado, es muy frecuente que el píleo esté salpicado con restos de tierra, hierba y hojas adheridos.

Laminas: son decurrentes, quebradizas, anchas, ventrudas, medianamente apretadas, con lamélulas. Su color blanco, algo crema, se mancha levemente de ocre al dañarlas, a veces segregan unas gotitas transparentes como gotas de agua.

Volva: cilíndrico, corto con respecto al sombrero, de 2 a 3 cm de diámetro, robusto, quebradizo, todo el conjunto es de color blanco, manchado de tonos crema en la madurez.

Himenio: compacto, quebradizo, espeso y de color blanco que adopta un tono amarillento con el tiempo.

Características microscópicas

Esporada: blanca cremosa

Esporas: ovoides, con una decoración verrugosa muy delicada, de 8.5*7-9,5 μm .

(Cuesta y Jiménez 2016).



Figura 4. Imagen macroscópica de *Russula delica* (Autoría 2019).

1.2.2. *Boletus edulis*

Características macroscópicas

Píleo: convexo, semiesférico, con un diámetro de 25 a 30 cm. y un color marrón claro, pardo, canela, más oscuro en el centro y frecuentemente difuminado a los bordes, donde llega a ser casi blanco.

Cutícula: lisa, ligeramente viscosa cuando joven.

Himenio: tubular, los tubos son libres y largos, de 10 a 20 mm, fácilmente separables del contexto e inicialmente blancos tornándose amarillos y posteriormente verdosos con la edad. Sus poros son circulares del mismo color que los tubos.

Estípite: de 5 a 20 cm de largo y 2 a 8 cm de diámetro, consistente, robusto, frecuentemente más engrosado en la parte media, sobre todo en los ejemplares jóvenes.

Superficie: reticulada con una red blanca a ligeramente café clara con la edad.

Contexto: blanco a rojizo debajo de la cutícula, de consistencia esponjosa.

Características microscópicas

Esporada: amarillo-oliváceo, esporas fusiformes, 14-18 x 5-5 14 μm , no amiloides.

Cistidios: fusiformes

Hábito de crecimiento: gregario, creciendo en grupos dispersos en bosque de coníferas, preferiblemente en suelos ácidos.

(Ardo-López 2007)



Figura 5. Imagen macroscópica de *Boletus edulis* (Autoría 2019).

1.2.3. *Turbinellus floccosus*

Características macroscópicas

Basidioma: de 2-27 cm de longitud y 3.5-12.5 cm de diámetro, naranja claro a naranja rojizo en algunas zonas, con superficie irregular, rugosa a flocosa con protuberancias rectangulares anaranjadas oscuras.

Base: cilíndrica en estado juvenil a ensanchada con la edad dando una forma de trompeta. El margen es ligeramente en curvada hacia abajo y con el borde liso cuando joven a irregular con la edad, la parte interna es rugosa y escamosa con protuberancias.

Láminas: decurrentes, blanco a crema con tonalidades amarillo claro.

Himenio: con apariencia arrugada, con venas, crema a amarillo claro.

Estípite: mide de 2.8 a 3.4 cm de diámetro, es de color crema a amarillo claro, con superficie lisa a irregular.

Contexto crema tornándose ligeramente café con la edad

Características microscópicas

Esporada: café pálido.

Basidiosporas: de 11.0-19 x 5.0-10 μm , elípticas a cilíndricas, verde amarillentas y superficie rugosa, tienen un contenido de color verde amarillento brillante y ápulo excéntricos de 1 a 2 μm de longitud.

Hábito de crecimiento y distribución solitaria a gregaria o en pequeños grupos, se desarrolla en el suelo en zonas de musgo creciendo principalmente cerca a plántulas y árboles jóvenes de oyamel y en bosques de oyamel con pino (Ardo-López 2007).



Figura 6. Imagen macroscópica de *Turbinellus floccosus* (Autoría 2019).

1.2.4. *Amanita rubescens*

Características macroscópicas

Píleo: de 5-88 mm de diámetro, de globoso a hemisférico aplanado.

Cutícula: lisa, cubierta de escamas membranosa, blanquecina sobre fondo grisáceo con tintes rojizos, distribuida más o menos en círculos concéntricos.

Láminas: libres apretadas, blancas, con aristas enteras y con color.

Estípite: de 76-132 * 12-18 mm, central, cilíndrico, ligeramente atenuado en el ápice y engrosado en la base, con bulbo prominente, blanco que se va tiñendo de rojo, especialmente en la base, anillo membranoso, en falda, blanco, con margen festoneado, con tintes rojizos, volva floconosa, fugaz, teñida de rojo.

Características microscópicas

Basidios: claviformes, fusiformes, tetraspóricos, sin fibula basal

Basidiósporas: de subglobosas a subcilíndricas, predominando elipsoidales, lisas, hialinas, gutuladas, apiculadas

Queilocistidios claviformes a vesiculosos. Pleurocistidios no observados.

Píleipellis de hifas paralelas, gelatinizada, sin fíbulas.

Esferocitos en las escamas del píleo (Merino-Alcántara 2017).



Figura 7. Imagen macroscópica de *Amanita rubescens* (Autoría 2019).

1.2.5. *Pholiota lenta*

Características macroscópicas

Píleo: convexo a deprimido en el centro con los bordes generalmente un poco levantado y con los márgenes revueltos hacia abajo, de 4 a 10 cm de diámetro, con superficie muy viscosa de color ocráceo claro en el centro y progresivamente decolorado hacia los bordes donde puede llevar en los ejemplares jóvenes escamillas restos del velo general.

Laminas: presenta láminas finas y apretadas, escotadas o subdecurrentes por un pequeño diente al principio cremas o cuero claro y luego se van poniendo arcillosas a color café con leche por las esporas.

Volva: cilíndrica y relativamente corto, de 3 a 7 cm*1 a 1.5 cm, con una superficie blanca y pulverulenta en lo alto y finalmente escamosa, con la edad se mancha de ocráceo.

Características microscópicas

Esporada: en masa marrón rojiza

Cutícula filamentosa: formada por una capa de hifas externa más o menos paralelas, finas, fibuladas y muy separadas por gelificación. Debajo presentan otra capa de hifas entremezcladas más gruesas y con paredes fuertemente incrustadas con pigmento marrón, con algunas hifas lactíferas marrones dispersos. Las aristas de las láminas tapizadas de numerosos cistidios alargados, fusiformes y algo ventrudos, terminando en un largo cuello con extremidades redondeada y en algunos con exudaciones extremas.

Basidios: cilíndricos o progresivamente ensanchados en la extremidad y tertaspóricos.

Esporas: elipsoidales o en forma de alubia, algunas un poco curvadas en el centro, lisas u sin poro germinativo.

(Asociación Cultural “Baxauri” Kultur Elkartea. Mikología. Bajauri.

<http://www.fichasmicologicas.com/?micos=1&alf=p&art=754>).



Figura 8. Imagen macroscópica de *Pholiota lenta* (Autoría 2019).

1.3. Conocimiento tradicional de los hongos

Desde épocas prehispánicas, las comunidades étnicas aledañas a regiones boscosas utilizan los recursos naturales que se encuentran disponibles para su supervivencia (Padilla y cols. 2005), generando un amplio conocimiento tradicional. Este se define como el conjunto de saberes y prácticas (creencias, leyendas, mitos, proverbios, canciones y otros) generadas, seleccionadas y acumuladas colectivamente (Ruan-Soto 2005), que incluyen sistemas de clasificación, observaciones empíricas del ambiente local, así como un sistema de manejo del recurso (Reyes 2009), siendo la calidad y cantidad de este conocimiento variante entre los miembros de las comunidades, dependiendo del género, edad, rango social, entre otros (Ruan-Soto 2005). Este conocimiento se transmite en el espacio y en el tiempo a través del lenguaje, iniciándose en el núcleo o unidad familiar y es compartido y reproducido mediante el diálogo directo entre el individuo, sus padres y abuelos o hijos y nietos (Toledo 2009) convirtiéndose así, en tradiciones

y complejos bioculturales (Toledo y Barrera 2008). El uso de los recursos está estrechamente relacionado con su abundancia y variabilidad, un ejemplo claro es el aprovechamiento tradicional de los hongos silvestres, los cuales han formado parte relevante de la cultura de diferentes grupos indígenas (Zamora y cols. 2000). El consumo de hongos tiene una tradición culinaria muy arraigada (Moreno-Fuentes y Bautista-Nava 2006), siendo el conocimiento micológico tradicional la base para el aprovechamiento de este recurso. En México, diversas comunidades rurales poseen un profundo conocimiento sobre hongos silvestres, desde el aspecto biológico, ecológico y cultural, así como sus estructuras morfológicas, lugar y época de crecimiento, sustratos en donde se desarrollan, tipo de vegetación propicios para su desarrollo y forma de uso (Bautista-Nava y cols. 2010). Se han estudiado principalmente desde hace casi 50 años (Herrera y Guzmán 1961), debido a su importancia como alimento básico por sus propiedades alimenticias superiores a la de muchos productos de origen vegetal (Montoya y cols. 2004), así como por sus cualidades medicinales (Guzmán 1994), su creciente valor comercial (Mariaca y cols. 2001) y por construir un recurso del que aún se desconocen importantes aspectos ecológico de manejo biotecnológico (Guzmán 1998). La diversidad de hongos en México es muy alta, se estima que existen más de 200,000 especies de hongos, pero solo el 4% son conocidos, el aprovechamiento de los hongos tiene un valor de uso (autoconsumo) sobre el valor de cambio (comercialización) (Guzmán 1998).

En México, este conocimiento tradicional micológico se ha desarrollado particularmente en el área central del país, vinculado a la rica herencia cultural prehispánica (Montoya y cols. 2008). Se ha reportado el uso de algunas especies de hongos, con fines terapéuticos, para el tratamiento de la hipertensión y la reducción del colesterol (Guzmán 1998).

1.4. Importancia medicinal de los hongos

En los países asiáticos, el uso de hongos con fines terapéuticos lleva más de mil años, se han registrado alrededor de 300 especies utilizadas para este fin (Garibay-Origel y cols. 2007). En el uso medicinal académico, en la actualidad, estos encabezan los ahora llamados medicamentos de primera generación, como las penicilinas y cefalosporinas (Reyes-García y cols. 2009). En estudios clínicos japoneses, se ha descubierto que extractos del hongo *Ganoderma* sp., producen

una mejora de calidad de vida como tratamiento para el cáncer. Actualmente se estudia una amplia variedad de hongos, en un esfuerzo por encontrar la cura del V.I.H. (Mata 2003). La psilocibina, sustancia de algunos hongos alucinógenos, causa relajación muscular, sensaciones de tranquilidad y bienestar, por lo que se usa en psiquiatría para tratar algunas patologías y depresiones fuertes (Cabarro 2012). En Europa se realizan estudios con especies de hongos como: *Lepista nuda* (con propiedades antibacterianas); *Trametes versicolor*, *Ganoderma applanatum* y *Schizophyllum commune*, los cuales poseen propiedades anticancerígenas (Mata 2003). En México, algunos hongos silvestres son utilizados como alimento debido a su excelente valor nutricional que es atribuido por sus propiedades medicinales. Siendo considerados nutraceuticos ya que tiene la doble función de nutrir y aportar determinados compuestos como antibióticos, antitumorales, hemostáticos, hipoglucémicos, purgantes y antioxidantes (Martínez y cols. 2001).

1.5. Composición química y valor nutricional

Desde un punto de vista nutricional, la composición química de los hongos se ha vuelto atractiva debido a que presentan similitudes con el valor nutricional que aportan los huevos, la leche y la carne (Duntar y cols. 2008), además que estos organismos contiene vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, ergosterol y niacina), así como una gran cantidad de aminoácidos esenciales, proteínas, grasas, cenizas, glucósidos, aceites volátiles, tocoferoles, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, folatos y ácidos orgánicos entre otros (Patel y Goyal 2012). El valor energético total de los hongos oscila entre 250 y 350 cal/kg en hongos frescos, es por ello que los hongos se consideran alimentos funcionales ya que proporcionan beneficios para la salud y son una fuente importante de compuestos biológicamente activos ya que brindan beneficios medicinales utilizados en la prevención y tratamiento de enfermedades (Rathee y cols. 2012), como antiinflamatorios, antioxidantes, inmunomoduladores, anticancerígenos, antivirales, antibacterianos, antifúngicos, hepatoprotectores, antineurodegenerativos, antidiabéticos, antiangiogénicos e hipoglucémicos, entre otros (Xu y Beelman 2015). Estos compuestos con actividad biológica se pueden encontrar en la pared celular de los hongos como polisacáridos (B-glucanos) y proteínas, o como metabolitos secundarios, como los compuestos

fenólicos, terpenos y esteroides. La concentración y eficacia de estos compuestos dependerá del tipo de hongo, sustrato, etapa de desarrollo, etc. (Guillamón y cols. 2010).

1.5.1. Polisacáridos

Estos son los compuestos con actividad biológica que más se han estudiado. Específicamente los polisacáridos de glucano. Se diferencian por su estructura primaria, tipo de enlace, grado de ramificación, peso molecular, solubilidad, etc. Algunos glucanos fúngicos son intracelulares (sirven como material de reserva), otros secretan en el medio y pocos están presentes en la pared celular. Con respecto a su solubilidad, estos pueden ser solubles en agua, solubles en álcali o insolubles (Ruiz-Herrera 2012). Las fracciones insolubles suelen ser componentes estructurales de la pared celular y reticuladas con otros polisacáridos como la quitina o con proteínas como las glicoproteínas, los glucanos insolubles corresponden al 50 - 80% y los glucanos solubles corresponden al 20 -50% de glucanos totales (He y cols. 2012). Los efectos terapéuticos de los polisacáridos son antioxidantes, antidiabéticos, antiinflamatorios, antimicrobianos anticancerígenos e inmunomoduladores (Elsayed y cols. 2014). Los glucanos bioactivos se han aislado de cuerpos fructíferos y de micelios producidos mediante fermentación sumergida (Song y cols. 2012). También se han identificado polisacáridos como complejos proteicos de polisacáridos con actividad inmunomoduladores y antitumorales (Fisher y Yang 2002).

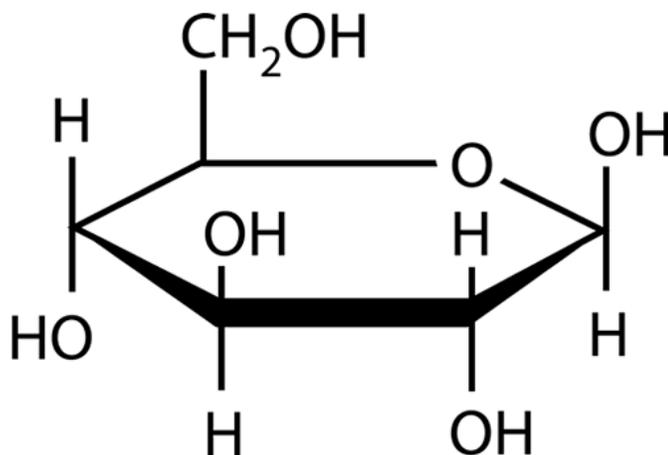


Figura 9. Estructura química básica de un polisacárido (Elsayed y cols. 2014).

1.5.2. Terpenos

Los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios de las plantas y los hongos. De la ruta biosintética de estos compuestos, se obtienen metabolitos primarios y secundario de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de los hongos. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas, carotenoides, ubiquinonas y esteroides. Suelen ser solubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C), de esta forma, los terpenos se clasifican por el número de isopreno que contienen. Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reaccionan hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o la ruta de metileritrito fosfato (MEP). El grupo de los terpenos, como ya se mencionó incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol) derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales que proporcionan el olor y el sabor característico (Ávalos-García 2009).

Los terpenos son de los grupos que se encuentran con mayor abundancia en algunos hongos, estos biocompuestos actúan como antiinflamatorios, algunos compuestos inhiben la síntesis del colesterol (Komoda y cols. 1989), otros contribuyen a la protección contra la aterosclerosis (Morigiwa y cols. 1986). Algunos cumplen la función de antioxidantes y otros cumplen la función de antivirales, antibacterianas y/o antifúngicas. La función y concentración de los biocompuestos pertenecientes a la clase de los terpenos dependerá de la especie del hongo (Niedermeyer y cols. 2005).

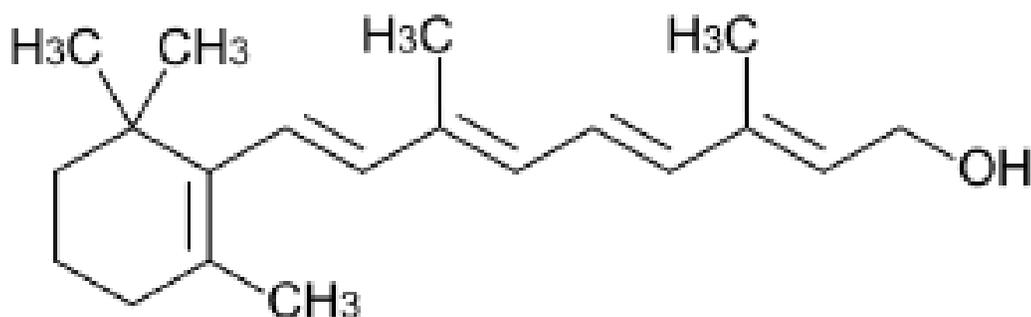


Figura. 10. Estructura química básica de un compuesto terpeno (Ávalos-García 2009).

1.5.3. Péptidos

Los hongos producen principalmente péptidos bioactivos como las lectinas, éstas se unen específicamente a los carbohidratos de la pared celular de los hongos y tiene la capacidad de aglutinar células (Liu y cols. 2006). Estos péptidos no tienen actividad enzimática, pero presentan actividad antifúngica. También producen proteínas bioactivas como las proteínas inmunomoduladoras fúngicas (FIP), son un nuevo grupo de proteínas bioactivas (Ko y cols. 1995), proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) estas son enzimas que inactivan los ribosomas al eliminar los residuos de adenosina del ARNr (Chu y cols. 2005), y lacasas que son enzimas fenol oxidasas ampliamente distribuidas en hongos basidiomicetos y ascomicetos, Estos hongos usan las lacasas para degradar sustratos lignocelulósicos, aunque se han aislado lacasas con actividad antitumoral.

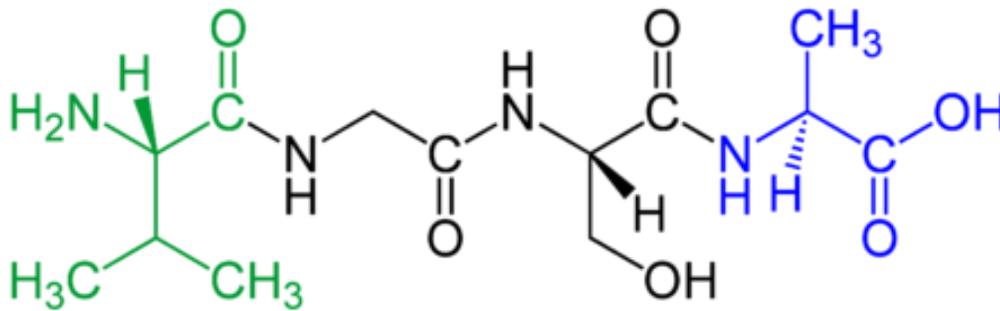


Figura 11. Estructura química básica de un péptido.

1.5.4. Saponinas

Las saponinas son compuestos que se forman cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo, pertenece a los metabolitos vegetales de alto interés. Pertenecen al grupo de los glicósidos, se pueden encontrar en forma de alcaloides esteroideos,

glicósidos esteroideos, glicósidos terpenos y glicósidos. Pueden ser terpenoides o alcaloides que contienen moléculas de azúcar en su estructura. Las agliconas son saponinas sin azúcar, denominadas como sapogeninas. Las propiedades surfactantes o detergentes similares a las del jabón que tienen las saponinas se deben a la aducción de un terpenoide hidrofóbico y un grupo hidrofílico, algunas son utilizadas como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (Cote y cols. 2010).

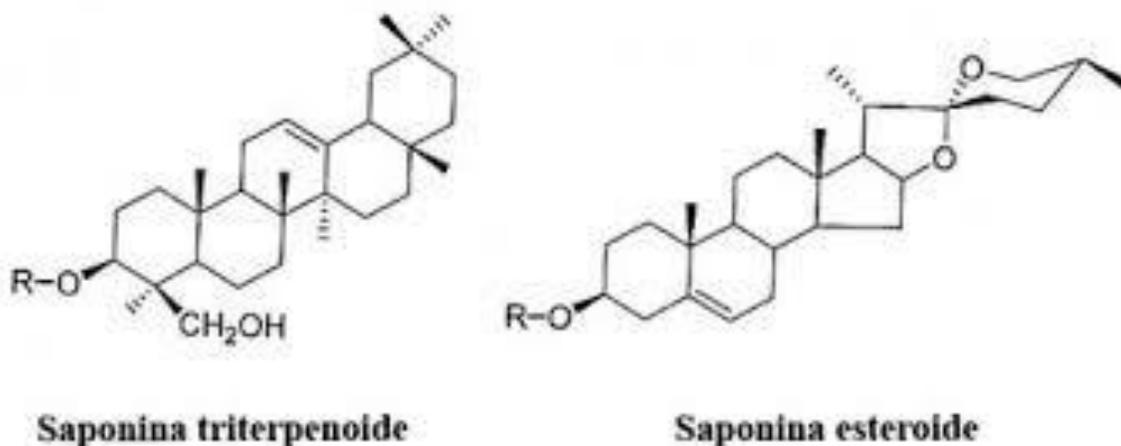


Figura 12. Estructura química de saponinas.

1.5.5. Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos), se encuentran en plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas. Se sintetizan a partir de la lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, a dosis altas suelen ser tóxicos y a dosis bajas pueden usarse en terapias como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Cote y cols. 2010).

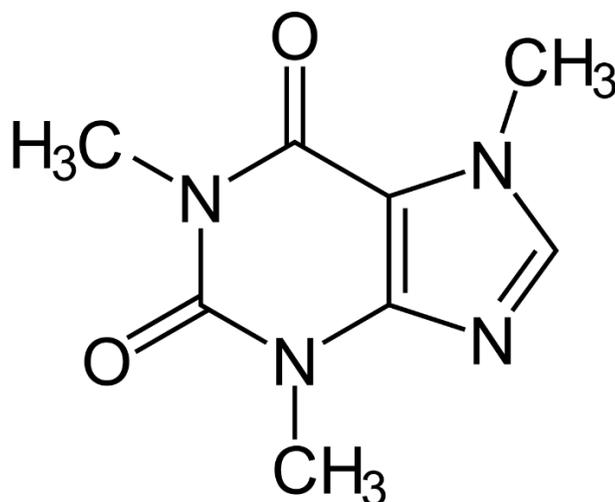


Figura 15. Estructura química básica de un compuesto alcaloide (Cote y cols. 2010).

1.5.6. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos pueden encontrarse distribuidos en vegetales y frutos, se derivan de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina, son metabolitos secundarios de gran importancia encontrados principalmente en plantas (López 2008). Tienen diferentes características químicas y actividades metabólicas, se han identificado alrededor de 8000 compuestos diferentes (Shahidi y Nazk 1995).

La actividad sensorial en los alimentos de origen vegetal y procesado, se relaciona con la presencia de compuestos fenólicos. Nombrados actualmente como compuestos fitoquímicos, los cuales presentan gran demanda por contribuir de manera positiva en la salud humana (Clifford 1992). Además, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos, por lo que, la obtención y preparación de productos con un alto contenido de estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, pudiendo incluso englobarlos dentro de los llamados alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional esta actividad antioxidante presente se asocia con un papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Berra y cols. 1995). El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad de quelar metales,

manteniendo, intercambiando o reduciendo su actividad catalítica o reduciéndolos (Decker 1997).

Químicamente, los fenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo a sus derivados funcionales. Las plantas y alimentos que contienen una amplia variedad de derivados fenólicos incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, y taninos, estos compuestos pueden ser pirogalol, miricetina, ácido cafeico, quercetina y catequina, entre otros, dentro de otras propiedades que se les confieren a los fenoles son la función de antibióticos, uso como pesticidas naturales, agentes protectores de rayos UV y aislantes de una prueba de paredes celulares (Shahidi y Naczk 2004).

1.5.6.1. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, tienen un núcleo de benzopireno, como base molecular compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (Kühnau 1976). Son sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina (Primo 2007). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran de 2 al 8 y los del anillo B desde 2' al 6' (Kühnau 1976). Se clasifican en:

- Flavanos: con un grupo -OH en posición 3 al anillo C (catequina).
- Flavonoles: tienen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C (quercetina).
- Flavonas: poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3 (dismetina).
- Antocianinas: tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Letan 1966).

Son pigmentos naturales, generalmente de color amarillo (Primo 2007). Protegen a las plantas del estrés oxidativo que es generado debido a la exposición al sol (Martínez y cols. 2014). Para establecer su capacidad antioxidante, los flavonoides deben presentar una estructura O-dihidroxi que participa en la deslocalización de electrones y proporciona una mayor estabilidad a la forma

radical, también deben de tener una doble ligadura en conjunción con la función 4-oxo del anillo C, por último, los anillos A y C deben tener grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Rice-Evans y cols. 1996). Estos compuestos pueden unirse a diversos polímeros biológicos como las enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres (Saskia y cols. 1998).

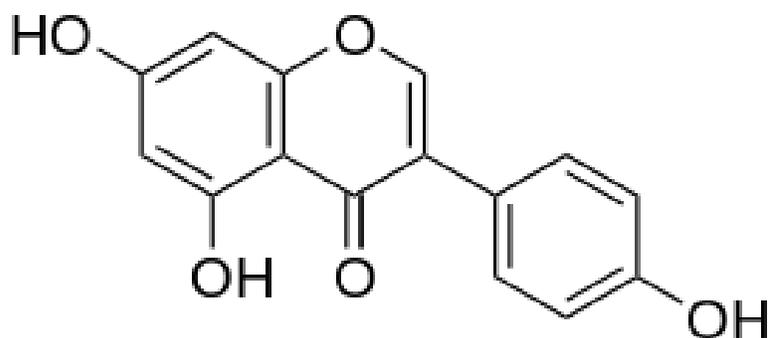


Figura 13. Estructura química básica de compuesto flavonoide (Martínez y cols. 2014).

1.5.6.2. Polifenoles

Los polifenoles son compuestos con anillos aromáticos hidroxilados (polihidroxilados), se derivan de la L-fenilalanina (Petti 2009). Su masa molecular varía entre los 500 a 4000 Da (Ricco y cols. 2015), estructuralmente son muy similares entre ellos (Alexis Biochemicals 2017), son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, en presencia de soluciones acuosas o alcohólicas de cloruro férrico, destacan por el intenso color verde, púrpura, azul o negro que presentan, (Lock 1988). Se clasifican en ácidos fenólicos (derivados del ácido cinámico y benzoico), alcoholes fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos condensados e hidrosolubles y lignanos (Nacz 2004; Abbas y cols. 2017).

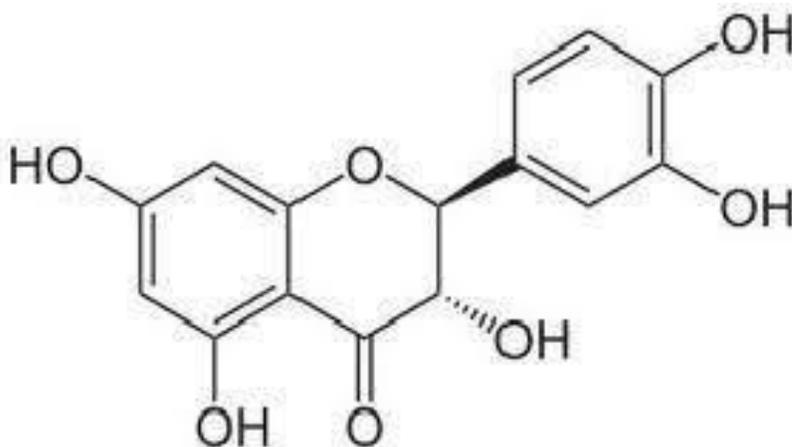


Figura 14. Estructura química básica de un polifenol (Abbas y cols. 2017).

1.6. Estrés oxidativo

Según (Yoshukawa 2002), el estrés oxidativo se puede definir como un estado en el que las cantidades oxidativas superan los sistemas antioxidantes debido a la pérdida del equilibrio entre ellos. Todas las células contienen sistemas moleculares que son vitales para el funcionamiento y la supervivencia adecuada. Principalmente en los organismos aerobios es fundamental la presencia de oxígeno para que se lleven a cabo procesos metabólicos como la transformación de los carbohidratos, grasas y proteínas para la producción normal de energía mediante un proceso de oxidación (Fig. 9). Los oxidantes son moléculas derivadas del oxígeno, puede ser un compuesto químico que contiene uno o más electrones no apareados en orbitales atómicos o moleculares conocido como radical libre (RL) o moléculas que contiene oxígeno que pueden o no tener electrones desapareados, pero que son reactivos en los tejidos, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) por sus siglas en inglés, incluyen superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH) (Vincent y Taylor 2006).

Diversos factores pueden ocasionar un desequilibrio entre las moléculas oxidantes y los antioxidantes, ocasionando una producción excesiva de RL y ROS. Este desequilibrio permite que estas moléculas ataquen compuestos químicos cercanos que llegan a estar involucrados en reacciones enzimáticas importantes, pueden ser componentes de las paredes celulares o

logrando ser parte de una molécula de ADN. Si se modifica su estructura química, su función en la célula puede perderse y el resultado puede ser senescencia celular o apoptosis (Cederbaum y cols. 2009). El daño celular causado por los radicales libres compromete la función celular y causar daños en los ácidos nucleicos, oxidación en proteínas y peroxidación en lípidos. Este es uno de los principales contribuyentes al envejecimiento y las enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, deterioro del sistema inmunitario, enfermedades hepáticas, diabetes mellitus, inflamación, insuficiencia renal, disfunción cerebral y estrés, entre otros (Kozarski y cols. 2015).

1.7. Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que a concentraciones relativamente bajas detienen la oxidación de otras moléculas mediante la iniciación de la inhibición prolongada de reacciones en cadena oxidativa. Estos antioxidantes actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres, impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrógeno. Los antioxidantes pueden eliminar o bloquear los radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica (Rivero y Betancort 2006).

La actividad de los compuestos antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de su estructura química (Royse y May 2003). Esta actividad en los polifenoles es la propiedad de mayor interés, debido a que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales reaccionan a radicales libres. Los antioxidantes se pueden utilizar para la prevención del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales, plantas u hongos es debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y particularmente a su propiedad de quelar metales (Asatiani y cols. 2010). Varios estudios previos, han establecido que los compuestos fenólicos de las plantas y hongos incluyendo los flavonoides son antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticariogénicos (Miranda 2003).

1.8. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

1.8.1. Técnicas analíticas cualitativas

1.8.1.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) es una técnica analítica cualitativa rápida y sencilla, que nos permite identificar a grandes rasgos que compuestos o familia de compuestos se encuentran presentes en un sustrato (Pérez 2000).

- Determina el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar como se transforman los reactivos para formar productos, lo que nos permite visualizar cuando la transformación química ha terminado

La muestra a analizar se coloca cerca de uno de los extremos de la lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cámara cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente.

➤ Adsorbentes y eluyentes

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello, se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares

(alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. El adsorbente interactúa con las sustancias mediante interacción dipolo-dipolo o mediante enlace de hidrógeno si lo presentan. El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. El eluyente puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite desplazarse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada. El eluyente idóneo para cada análisis se determina por el “método de ensayo-error”

1.8.2. Técnicas analíticas cuantitativas

1.8.2.1. Cuantificación de fenoles

Este método se fundamenta en el empleo del reactivo Folin-Ciocalteu, que es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, que se reduce al oxidar los fenoles a pH básico formando una mezcla de óxido de tungsteno y molibdeno, cromógenos de color azul. La coloración que produce presenta una absorbancia máxima alrededor de los 750 nm y es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto (Tabarez-Sánchez 2017).

1.8.2.2. Cuantificación de polifenoles

Este método tiene un fundamento similar al de fenoles totales, la diferencia entre ellos es la concentración normal del reactivo de Folin-Ciocalteu y el estándar empleado para la curva de

calibración que lo hace específico para estructuras similares al ácido tánico. La coloración que se produce presenta una absorbancia máxima a 765 nm (Tabarez- Sánchez 2017).

1.8.2.3. Cuantificación de flavonoides

El método se basa en la reacción formada por los iones de aluminio con las estructuras generales de flavonoides formando un complejo de coloración amarilla. Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, los grupos hidroxilo del anillo B de los compuestos flavonoides en las posiciones C₃' y C₄' con presencia de CH₃COOK sufren una oxidación transformándose en carbonilos. En la segunda etapa, la presencia de tricloruro de aluminio promueve cambios en el anillo A en C₅, el aluminio se coordina con el oxígeno en C₄' y en el C₃'. En esta etapa, la muestra adquiere un color amarillo. La coloración que se produce presenta una absorbancia máxima a 415 nm (Tabarez- Sánchez 2017).

1.8.3. Método para actividad antioxidante 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe el metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Tabarez- Sánchez 2017).

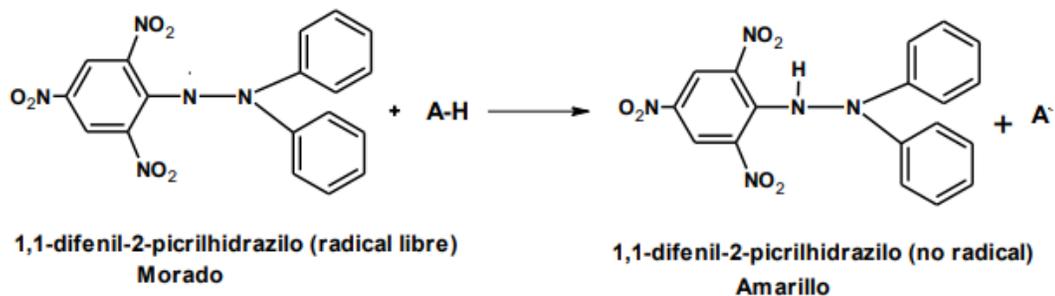


Figura 16. Estructura del radical DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam y cols. 2012).

El resultado de esta prueba es la obtención de la concentración inhibitoria 50 (IC50), definido como la cantidad de antioxidante necesario para inhibir o estabilizar la concentración inicial de DPPH hasta el 50%.

1.8.4. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido (Fig. 17). De manera general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interactúe con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para eluir a las moléculas en la muestra. En el caso particular de la HPLC, una muestra en estado líquido es arrastrada por una corriente líquida llamada eluyente. Como fase estacionaria actúa un sólido finamente dividido (diámetro

de partícula 3, 5, 10 μm). Los principales mecanismos de interacción de esta técnica son: adsorción superficial, partición, intercambio iónico y exclusión molecular (Fernández 2009).

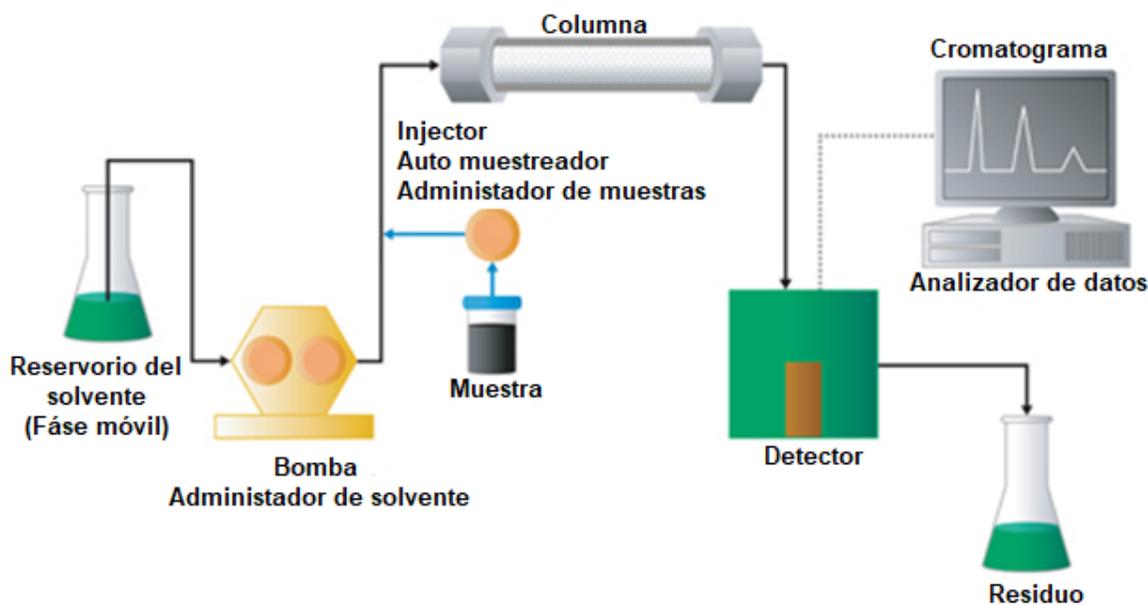


Figura 17. Etapas del proceso de cromatografía líquida de alta resolución (Fernández 2009).

De acuerdo con Rosales (2008), como medio de detección para esta técnica se pueden utilizar cualquiera de las propiedades físicas o químicas que se puedan medir en la disolución. Generalmente, los detectores de la HPLC no son destructivos empleándose comúnmente: UV/Vis, fotodiodos, índice de refracción, fluorescencia, conductividad, dispersión de luz y espectrometría de masas. De los detectores antes mencionados el más utilizado es el de UV/Vis, el cual se emplea para sustancias que absorben radiación y utiliza lámparas de deuterio, xenón o wolframio (tungsteno). Las características que hacen que esta técnica analítica sea tan utilizada son: la selectividad, reproducibilidad, sensibilidad y la rapidez en los análisis. Según Lee y cols. (2010), estas características proporcionan a la técnica ciertas ventajas como lo son: el tiempo de análisis reducido, menor consumo de disolventes, menor dispersión de los solutos a analizar y ahorro de costos.

2. ANTECEDENTES

Shu-Yao y cols. (2007) evaluaron la actividad antioxidante del extracto etanólico y el extracto de agua caliente de tres diferentes especies de hongos silvestres (*Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* y *Boletus edulis*). Reportaron que el extracto etanólico de los tres hongos muestran mejor actividad antioxidante en comparación a los extractos de agua caliente. Para ambos extractos, *B. edulis* presentó mayor actividad antioxidante debido a que posee mayor contenido de fenoles totales y tocoferoles. Vaz y cols. (2010) estudiaron la actividad antioxidante e inhibidora de crecimiento de extractos fenólicos (metanólicos, etanólicos) y polisacáridos (agua hirviendo) de *Citocybe alexandri* y *Lepista inversa* en líneas celulares tumorales humanas. Evaluaron la capacidad de eliminar radicales libres y la inhibición de la peroxidación lipídica. La inhibición del crecimiento celular inducida por extracto se midió en cuatro líneas celulares tumorales (cáncer de pulmón, mama, colon y gástrico). Como resultados obtuvieron que el extracto polisacárido de *L. inversa* fue el más potente como antioxidante, mientras que el extracto fenólico etanólico de *C. alexandri* fue el más potente como inhibidor del crecimiento de las líneas celulares. Chelela y cols. (2014) reportaron el efecto de los extractos crudos de distintas especies de hongos silvestres, *Russula cellulata*, *Russula kivuensis*, *Amanita muscaria* y *Amanita phalloides*, colectados en la Sierra Sur de Tanzania. Mostraron que la dosis letal 50 (DL₅₀) de los extractos obtenidos con etanol (MS1E) y éter de petróleo (MS1PE) de *A. muscaria* presentaron el mejor efecto con una DL₅₀ de 11.00 y 13.72 mg/mL, respectivamente.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, el conocimiento tradicional y funcional micológico se ha desarrollado en el área central del país debido a la gran diversidad de organismos presentes. El conocimiento tradicional de los hongos comestibles silvestres ha aumentado a lo largo de los años debido a su importancia como alimentos básicos ya que poseen propiedades nutritivas que superan a los alimentos convencionales como la carne o los lácteos, así como por sus cualidades medicinales. Sin embargo, las propiedades químicas funcionales, son las que generan mayor interés (Estrada-Martínez y cols. 2009). En las estructuras básicas de los hongos se pueden encontrar compuestos químicos con actividad biológica, como lo son los polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas, así como productos naturales resultantes de su metabolismo secundario como los compuestos terpenos, glicósidos y fenólicos, que en el organismo cumplen diversas funciones, como anticancerígenos, antiinflamatorios, antimicrobianos y principalmente antioxidantes. Los extractos de *Citocybe alexandri*, *Lepista*, *Russula cellulata*, *Russula kivuensis*, *Amanita muscaria*, *Amanita phalloide* y *Lactarius deterrimus* han mostrado eficacia como antioxidantes. La extracción de estos compuestos para la elaboración de suplementos alimenticios podría ser una ventana para el desarrollo de innovación científica y tecnológica en el país enfocada al beneficio de la salud (Baldayan 2012).

4. HIPÓTESIS

Los hongos silvestres *Russula delica*, *Boletus edulis*, *Turbinellus floccosus*, *Amanita rubescens* y *Pholiota lenta* del volcán La Malinche contiene metabolitos fenólicos con capacidad antioxidante.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar el perfil micoquímico de extractos de hongos silvestres *Russula delica*, *Boletus edulis*, *Turbinellus floccosus*, *Amanita rubescens* y *Pholiota lenta* del volcán la Malinche y cuantificar su actividad antioxidante.

5.2. Objetivos específicos

En los hongos Russula delica, Boletus edulis, Turbinellus floccosus, Amanita rubescens y Pholiota lenta.

- ✓ Realizar un análisis químico preliminar mediante cromatografía en capa fina para conocer las principales familias de compuestos presentes en los extractos.
- ✓ Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos de los extractos para conocer las concentraciones de los mismos.
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante in vitro de los extractos por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

6. METODOLOGÍA

6.1. Colecta de los hongos

La colecta de las especies de hongos silvestres comestibles se realizó durante los meses de octubre-noviembre del año 2019 en las faldas del volcán La Malinche. Se localizaron los cuerpos fructíferos mediante recorridos por el bosque ubicando montículos de hojarasca, la búsqueda se realizó alrededor de los árboles o cerca de ellos, una vez ubicado el espécimen, se movió la hojarasca con movimientos suaves y procurando tener el mayor cuidado a fin de no maltratar el cuerpo fructífero, una vez descubierto se recolectaron los individuos maduros. Se sacudió el cuerpo fructífero en el lugar de colecta para liberar el mayor número de esporas posible y se tapó con la hojarasca para que el micelio no se deshidratara. Los especímenes recolectados fueron trasladados y depositados en el laboratorio de Biología Experimental de la Licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.



Figura. 18. Sitio de colecta con vista satelital (Google Earth).

Las especies de hongos que se utilizaron para el estudio se enlistan en la Tabla 2; Se anotan los nombres científicos, los nombres comunes, el disolvente utilizado y la clave utilizada para la parte experimental, así como el número de identificación. La colecta se hizo en dos etapas y al finalizar se obtuvieron de 1.5 kg a 2.5 kg de hongos por especie en peso fresco.

Tabla 2. Listado de hongos con su nombre científico, nombre común y clave de identificación para cada disolvente.

Nombre científico	Nombre común	Disolvente	Número	Clave
<i>Russulla delica</i>	Tecax	Metanol	1	RDTM1
		Etanol	2	RDTE2
<i>Boletus edulis</i>	Pante	Metanol	3	BEPM3
		Etanol	4	BEPE4
<i>Turbinellus floccosus</i>	Corneta	Metanol	5	TFCM5
		Etanol	6	TFCE6
<i>Amanita rubescens</i>	Mantequilla	Metanol	7	ARMM7
		Etanol	8	ARME8
<i>Pholiota lenta</i>	Xolet	Metanol	9	PLXM9
		Etanol	10	PLXE10

6.2. Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos, se utilizaron 1.5 kg de hongo fresco, se deshidrataron a 55 °C durante 72 h. Una vez transcurrido el tiempo de deshidratación se inició la molienda de la materia orgánica seca hasta llegar al pulverizado. La maceración se realizó por tres días consecutivos utilizando 20 g del pulverizado de cada hongo y 50 mL del disolvente correspondiente (metanol y etanol). Se dejó reposar por 24 hrs. La filtración se inició al transcurrir las 24 hrs de la primera maceración utilizando papel filtro de poro mediano y fino. Una vez transcurrido el tiempo de maceración, se concentró el disolvente de cada hongo hasta tener un

volumen total de 150 mL. Posteriormente, se realizó la evaporación utilizando un rotavapor EVELSA. Para evaporar el metanol se ajustó una temperatura de 64.7 °C y para evaporar el etanol se ajustó una temperatura de 78.37 °C. Una vez que el concentrado tomó una consistencia viscosa se recolectó el concentrado utilizando una pipeta Pasteur y aproximadamente 5 mL del disolvente correspondiente. Finalizado el procedimiento, los extractos se llevaron al desecador para eliminar el sobrante acuoso. Se pasó a la liofilizadora por 10 días para asegurar la eliminación de la sustancia acuosa. Pasado el tiempo de liofilización, los extractos se pasaron a ultracongelación para conservar y evitar la contaminación de los extractos.

6.3. Análisis cualitativo de los extractos

6.3.1. Cromatografía en capa fina

Se reactivaron los extractos con 1 mL de disolvente antes de pasar a ultracongelación, posteriormente se realizó la TLC con fase estacionaria: Silica gel 60 F₂₅₄ para realizar los métodos de detección que se muestran en la tabla 2. Se utilizaron 2 fases móviles con polaridades diferentes: TLC con fase móvil DCM MeOH (95:5) y TLC con fase móvil AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2).

Tabla 3. Ensayos para la identificación de familias de metabolitos.

Tipos de compuestos detectados	Método de detección/Reactivo
Compuestos fenólicos	Cloruro de hierro (III) al 5% (FeCl ₃)
Flavonoides	Tricloruro de aluminio al 10 % (AlCl ₃)
Actividad antioxidante	DPPH
Terpenos, isoprenoides y saponinas	Vainillina(H ₂ SO ₄)
	Liebermann-Burchard
	p-Anisaldehído/ H ₂ SO ₄

Alcoholes, aldehídos, compuestos insaturados, aminas y sulfóxidos	Permanganato de potasio (KMnO ₄)
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff
Antraquinonas y/o cumarinas	Reactivo de Borntrager

6.4. Análisis cuantitativo de los extractos

6.4.1. Análisis colorimétricos

6.4.1.1. Cuantificación de fenoles totales

La curva de calibración se realizó con una solución stock de ácido gálico (AG) 0.85 mg/mL, se prepararon diluciones de 0-5 mM en H₂O. Para la preparación del extracto se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de metanol. El blanco se preparó con 50 µL de extracto y se adiciono 650 µL de H₂O. En un tubo Eppendorf se agregaron 60 µL y 600 µL de solución A (Anexo 2) y 120 µL de NaOH 0.5 N, se dejaron reposar en la oscuridad por 10 min (termomix 10 min, 30 x 10 rpm, 30 °C). Se adicionaron 60 µL del reactivo Folin-Ciocalteu al 1 N, permitiendo la reacción por 30 min con agitación en la oscuridad (termomix 30 min, 30 x 10 rpm, 30 °C), se colocaron 200 µL de cada reacción en una placa multipozos por triplicado, se leyó en espectrofotómetro para microplacas Epoch a una absorbancia de 750 nm.

6.4.1.2. Cuantificación de polifenoles

La curva de calibración se realizó con una solución stock de ácido tánico (AT) 1 mg en H₂O, se prepararon diluciones de 0-1 mg/mL de AT. Para la preparación del extracto se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de metanol-agua (1:1). El blanco se preparó con 50 µL de extracto y se adicionó 950 µL de H₂O. En un tubo Eppendorf se agregaron 50 µL de extracto, 400 µL de Na₂CO₃ al 1M y 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu al 2 N, permitiendo la reacción por 20 min con agitación en la oscuridad (termomix 20 min, 20x10 rpm, 30 °C), se colocaron

200 μ L de cada reacción en una placa multipozos por triplicado, se leyó en espectrofotómetro para microplacas Epoch a una absorbancia de 765 nm.

6.4.1.3. Cuantificación de flavonoides

La curva de calibración se realizó con una solución stock de quercetina (Q) 0.2 mg/mL en etanol al 98%, se prepararon diluciones de 0-0.2 mg/mL de Q. Para la preparación del extracto se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de etanol al 98%. El blanco se preparó con 100 μ L de extracto y se adicioneo 900 μ L de etanol al 98%. En un tubo Eppendorf se agregaron 100 μ L de extracto, 300 μ L de etanol al 98%, 20 μ L de CH₃COOK se mezclaron utilizando un vórtex. Posteriormente, se agregó 560 μ L de H₂O, permitiendo la reacción por 30 min con agitación en la oscuridad (termomix 30 min, 30x10 rpm, 30 °C), se colocaron 200 μ L de cada reacción en una placa multipozos por triplicado, se leyó en espectrofotómetro para microplacas Epoch a una absorbancia de 415 nm.

6.5 Actividad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Se preparó una solución stock de DPPH al 1M disuelto en etanol absoluto, con la solución stock, se preparó una solución de trabajo (dilución a 133.33 mM en 50mL EtOH absoluto). Las muestras se prepararon como se muestra a continuación. Se incubaron por 30 min a 37 °C con 40x10 rpm en una placa multipozos en cuádruple, se leyó en espectrofotómetro para microplacas Epoch a una absorbancia de 517 nm.

	Blanco	Control	Muestra	Blanco de muestra
EtOH	200 μ L	50 μ L	0 μ L	150 μ L
DPPH	0 μ L	150 μ L	150 μ L	0 μ L
Muestra	0 μ L	0 μ L	50 μ L	50 μ L

Para obtener el % de inhibición se aplica la siguiente formula.

$$\%I = (Ab_{\text{blk}} - Ab_{\text{m}}/Ab_{\text{c}})*100$$

$\%I$ = Porcentaje de inhibición

Ab_{blk} = Promedio de la absorbancia del blanco de la muestra

Ab_{m} = Promedio de la absorbancia de la muestra

Ab_{c} = Promedio de la absorbancia del control

6.6 Análisis estadístico

Para la obtención de las curvas dosis respuesta se analizaron los extractos individualmente con un análisis de regresión no lineal por triplicado. Una vez obtenidas las concentraciones de las curvas dosis respuesta, se hizo la comparación de los extractos utilizando un análisis de ANOVA de una vía utilizando el programa The GraphPad Prism 8.

7 RESULTADOS

En la tabla 4, se puede observar los gramos de muestra que se utilizaron para la extracción y los gramos de extractos obtenidos después de la extracción, teniendo al extracto metanólico de *A. rubescens* con la mayor cantidad de extracción en gramos (3.90 g). Sin embargo, el extracto metanólico de *R. delica* mostró el mejor rendimiento de extracción, con un porcentaje de extracción del 22.75%.

Tabla 4. Rendimientos de extracción de los extractos metanólicos y etanólicos

Extracto	Muestra (g)	WE (g)	% R
RDTM1	15	3.41	22.75
RDTE2	15	1.95	13.03
BEPM3	20	1.71	8.54
BEPE4	20	3.81	19.06
TFCM5	20	0.96	4.80
TFCE6	20	2.12	10.59
ARMM7	20	3.90	19.51
ARME8	20	2.13	10.64
PLXM9	15	0.50	3.32
PLXE10	15	1.26	8.40

En la tabla 4. Se muestran los gramos utilizados para la extracción de cada extracto, así como el peso final obtenido de cada extracto. Se observó que el peso mayor se obtuvo en el extracto metanólico de *A. rubescens* con 3.90 g, seguido del extracto etanólico de *B. edulis* con 3.81 g y el extracto metanólico de *R. delica* con 3.41 g. El extracto etanólico de *A. rubescens* mostró un peso final de 2.13 g, difiriendo con una décima del extracto etanólico de *T. floccosus*. Para el extracto etanólico de *R. delica* se obtuvo un peso de 1.95 g, secundando el extracto metanólico de *B. edulis* con un peso de 1.75 g, por último, el extracto etanólico de *P. lenta*. Sin embargo,

los pesos más bajos se obtuvieron en los extractos etanólicos de *T. floccosus* y *P. lenta*, con un peso de 0.96 g y 0.50 g, respectivamente.

En la Figura 19, se muestra que el rendimiento de extracción de los extractos metanólicos y etanólicos. Se obtuvo el mayor rendimiento en el extracto metanólico de *R. delica*, el extracto metanólico de *A. rubescens*, presenta una diferencia mínima con el extracto etanólico de *B. edulis*, seguidos del extracto etanólico de *R. delica*. Los extractos etanólicos de *A. rubescens* y *T. floccosus* difieren mínimamente, similar diferencia se presenta en el extracto metanólico de *B. edulis* y el extracto etanólico de *P. lenta*. Los porcentajes de extracción más bajos se obtuvieron en los extractos metanólicos de *T. floccosus* y *P. lenta*

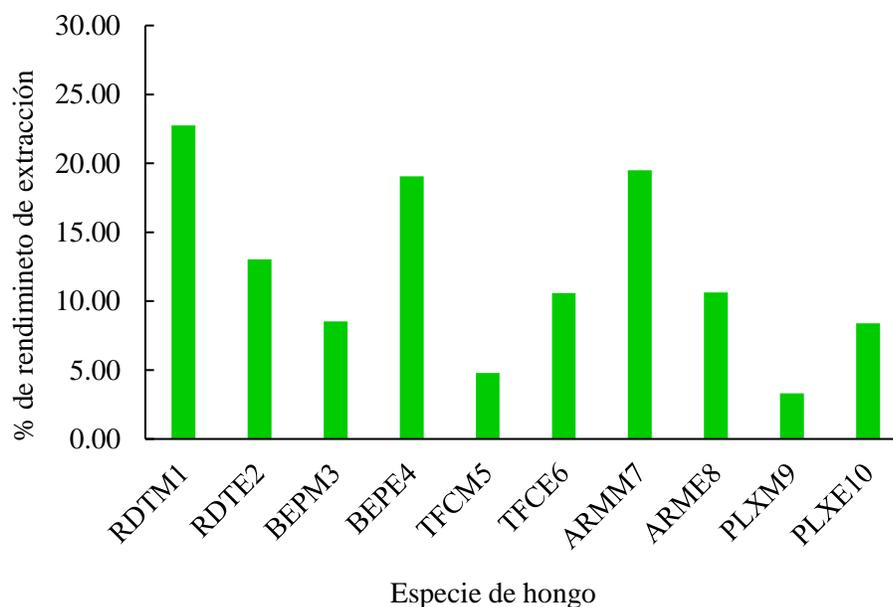


Figura 19. Rendimientos de extracción de los extractos metanólicos y etanólicos.

7.1 TLC con fase móvil DCM MeOH (95:5)

En la Figura 20, se observa la TLC con una fase móvil DCM.MeOH (95:5), el arrastre de los metabolitos obtenidos de los 10 extractos que son medianamente polares, observados con luz UV a una intensidad de onda de 245 nm (Fig. 20 A), y los metabolitos de alta polaridad, observados con luz UV a una intensidad de onda de 356 nm (Fig. 20 B). En la Figura (20 A), se observa en el hongo *R. delica*, en ambos disolventes (1 y 2) la ausencia de compuestos polares a diferencia del resto de los hongos en sus respectivos disolventes, revelados a una intensidad de 254 nm de luz UV. Sin embargo, al revelarlos a una intensidad de 365 nm, la presencia de metabolitos polares se hace presente en todos los hongos con sus respectivos disolventes (Fig. 20 B). De igual forma, se puede observar la presencia de metabolitos de mediana polaridad al ser revelados a 254 nm de magnitud de luz UV (Fig. 20 A), contrario a la ausencia de metabolitos de mediana polaridad en los hongos *P. lenta* y *A. rubescens*, tanto en EtOH como en MeOH, respectivamente, al ser revelados a una longitud de onda de 365 nm (Fig. 20 B).

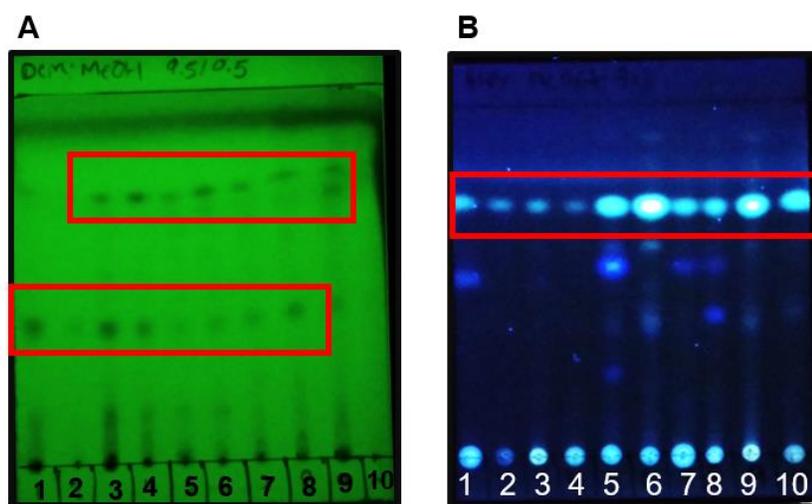


Figura 20. TLC con fase móvil: DCM-MeOH (95:5). Observada con luz UV a una intensidad de onda de 254 nm (A) y 365 nm (B).

7.1.1 TLC con revelador colorimétrico para compuestos fenólicos

En la TLC fase móvil DCM-MeOH (95:5) con revelado colorimétrico de cloruro de hierro III al 5% para identificar compuestos fenólicos (Fig. 21), se observa la presencia de estos compuestos con polaridad alta solo el hongo *A. rubescens* extraído con etanol (8), así como la presencia de compuestos medianamente polares en los hongos *B. edulis* en ambos disolventes (3 y 4), *T. floccosus* extraído con etanol (6) y una ligera coloración en el extracto el hongo *A. rubescens* extraído con metanol (7) y la ausencia total de estos compuestos en los hongos *R. delica* (1 y 2), y *P. lenta* (9 y 10) en ambos disolventes, de igual manera en el hongo *T. floccosus* extraído con metanol (5).

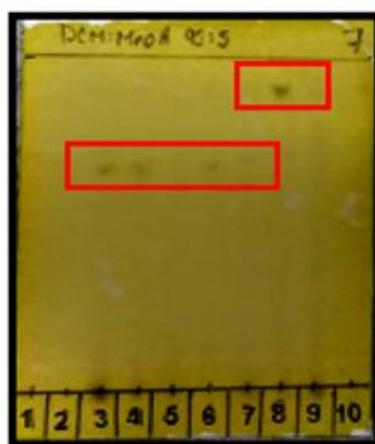


Figura 21. Cromatografía en capa fina con fase móvil: DCM-MeOH (95:5). Revelado colorimétrico para compuestos fenólicos con método de detección de Cloruro de hierro III al 5% observado a luz normal.

7.1.2 TLC con revelador colorimétrico para flavonoides

La TLC fase móvil DCM-MeOH (95:5) para flavonoides (Fig. 22) mostró 2 bandas que resaltan la presencia de estos compuestos. En la primer banda de alta polaridad se puede observar una mayor concentración de estos compuestos en los hongos *T. floccosus* en ambos disolventes (5 y 6) y *P. lenta* extraído con metanol (9), así como la presencia de los mismos, pero con una menor

concentración en los hongos *R. delica* (1 y 2), *B. edulis*, (3 y 4) *A. rubescens* (7 y 8) en ambos disolventes, respectivamente. En la segunda banda se resalta también compuestos de alta polaridad, pero que difieren ligeramente de la primer banda se muestra una patrón de presencia similar, relatando mayor concentración de flavonoides en el hongo *T. floccosus* en ambos disolventes (5 y 6) y una ausencia total de flavonoides en el extracto del hongo *R. delica* (2) y en el extracto del hongo *P. lenta* ambos extraídos con etanol (10).



Figura 23. Cromatografía en capa fina con fase móvil: DCM-MeOH (95:5). Revelado colorimétrico para flavonoides con Tricloruro de aluminio al 10% observado con luz UV a 365nm.

7.1.3 TLC con revelador para actividad antioxidante

La actividad antioxidante que muestra la TLC fase móvil DCM-MeOH (95:5) (Fig. 24) se puede observar en dos bandas, La primera que presenta compuestos de alta polaridad se muestra en los extractos de los hongos *T. floccosus* (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9 y 10) en ambos disolventes, En la segunda banda se observan compuestos de mediana polaridad con actividad antioxidante en el extracto de los hongos, *R. delica* (2) extraído con etanol, *B. edulis* (3 y 4), *T.*

floccosus, (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9 y 10) extraídos con ambos disolventes respectivamente y la ausencia total de compuestos con actividad antioxidante se muestra en el extracto del hongo *R. delica* extraído con metanol (1).

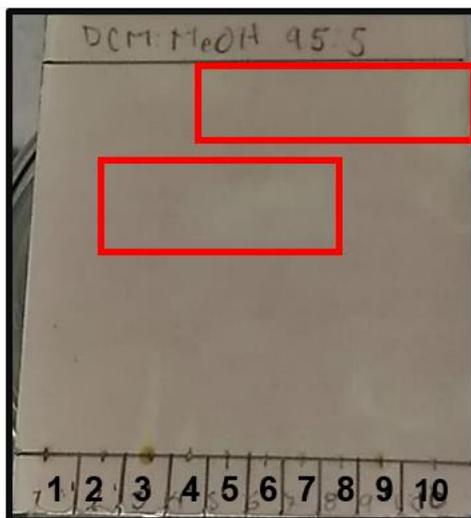


Figura 24. Cromatografía en capa fina con fase móvil: DCM-MeOH (95:5). Revelado colorimétrico para actividad antioxidante con el método de detección 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH).

7.1.4 TLC con revelador para terpenos, isoprenoides y saponinas

En la Figura 25 se observó el revelado para terpenos, isoprenoides y saponinas con tres diferentes métodos de detección. El primer método (A) resaltó la presencia de dichos compuestos en 3 bandas diferentes, la primer banda mostró compuestos de alta polaridad en los extractos de los hongos *A. rubescens* extraído con etanol (8) y *P. lenta* extraído con metanol (9), La segunda banda mostró compuestos de alta polaridad ligeramente diferentes a la primer banda, en donde se observaron la presencia de estos compuestos en los extractos de los hongos *B. edulis* (3 y 4), *T. floccosus* (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9 y 10) extraídos con ambos disolventes, La tercera banda mostró compuestos de baja polaridad en los hongos *B. edulis* (3 y 4), *T. floccosus* (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) extraídos con ambos compuestos respectivamente

y *P. lenta* extraídos con metanol (9), así como la completa ausencia de estos compuestos en los extractos del hongo *R. delica* extraídos con ambos disolventes (1 y 2).

El segundo método (B) también mostró 2 bandas, la primera resaltó la presencia de estos compuestos con alta polaridad en el extracto del hongo *A. rubescens* extraído con etanol, (8), la segunda banda que también tuvo una ligera variación en la polaridad, mostró estos compuestos en los extractos de los hongos *B. edulis* (3 y 4), *T. floccosus* (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) extraídos con ambos disolventes respectivamente y *P. lenta* extraídos con metanol (9) y completa ausencia de estos compuestos en los extractos del hongo *R. delica* extraídos con ambos disolventes (1 y 2).

El tercer método también resaltó 2 bandas de alta polaridad con una ligera diferencia, en la primer banda se observaron dichos compuestos con mayor concentración en ambos extractos del hongo *P. lenta* (9 y 10) y en concentraciones menores en los extractos de los hongos; *B. edulis* (3 y 4), *T. floccosus* (5 y 6) y *A. rubescens* (7 y 8), en la segunda banda, la presencia de los compuestos se mantiene parecida a la primer banda; en el extracto del hongo *P. lenta* extraído con metanol (9) con mayor intensidad y con menor concentración en los extractos de los hongos *B. edulis* (3 y 4), *T. floccosus* (5 y 6) y *A. rubescens* (7 y 8).



Figura 25. Cromatografía en capa fina con fase móvil: DCM-MeOH (95:5). Revelado colorimétrico para compuestos terpenos, isoprenoides y saponinas, con método de detección de Vainillina/H₂SO₄ (A), Liernermann-Burchard (B) y p-Anisaldehído/ H₂SO₄ (C).

7.1.5 TLC con revelador para otros compuestos

La TLC fase móvil: DCM-MeOH (95:5) (Fig. 26) con método de detección para alcoholes, aldehídos, compuestos insaturados, aminas y sulfóxidos con el método de detección de permanganato de potasio (KMnO₄) (A) mostró la presencia de estos compuestos en 2 bandas, la primera revela compuestos de alta polaridad presentes en los hongos *T. floccosus* (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9 y 10) extraídos con ambos disolventes, la segunda banda con una polaridad menor reveló una mayor concentración de estos compuestos en los extractos de los hongos *A. rubescens* (7 y 8) extraídos con ambos disolventes y *P. lenta* (9) extraído con metanol y una menor concentración de los compuestos antes mencionados en los extractos de los hongos *T. floccosus* (5 y 6) extraídos con ambos disolventes y *P. lenta* extraído con etanol (10).

La segunda revelación es para alcaloides con el método de detección Dragendorff (B), en donde se observó ligeramente la presencia de estos compuestos con baja polaridad en los extractos de los hongos *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9) extraído con metanol.

El tercer revelado es para antraquinonas y/o cumarinas con el método de detección Borntrager (C), no se encontró presencia de este tipo de metabolitos en ningún extracto.

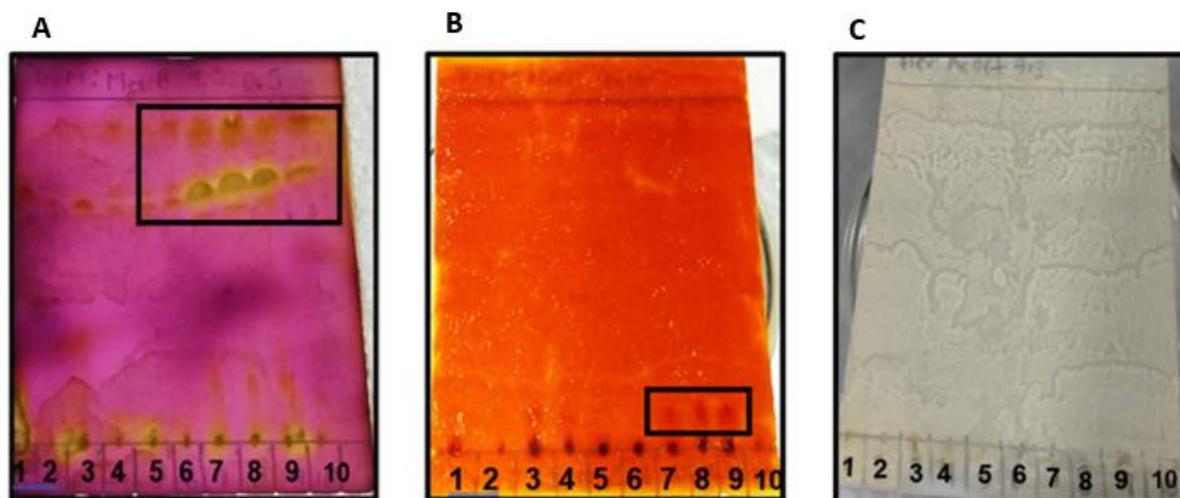


Figura 26. Cromatografía en capa fina con fase móvil: DCM-MeOH (95:5). Revelado colorimétrico para alcoholes, aldehídos, compuestos insaturados, aminas y sulfóxidos con el método de detección de permanganato de potasio (KMnO₄) (A), para alcaloides con el método

de detección Dragendorff (B) y para antraquinonas y/o cumarinas con el método de detección Borntrager (C).

7.2 TLC con fase móvil Acetato de etilo (AcOEt), Agua (H₂O), Metanol (MeOH) y Heptano (16:1:3:2)

En la Figura 27, se observa la TLC con una fase móvil AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2) se observó el arrastre de los metabolitos obtenidos de los 10 extractos que son medianamente polares, observados con luz UV a una intensidad de onda de 245 nm (Fig. 27 A), hasta los metabolitos de alta polaridad, observados con luz UV a una intensidad de onda de 356 nm (Fig. 27 B). En la Figura (27 A), se puede observar en el hongo *R. delica*, en ambos disolventes (1 y 2) la ausencia de compuestos polares a diferencia del resto de los hongos en sus respectivos disolventes, revelados a una intensidad de 254 nm de luz UV. Sin embargo, al revelarlos a una intensidad de 365 nm, la presencia de metabolitos polares se hace presente con mayor intensidad en los hongos *T. floccosus* (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9 y 10), con menor intensidad en los hongos *R. delica* (1) y *B. edulis* (3) extraídos con metanol (Fig. 27 B). Y la ausencia de metabolitos en el hongo *R. delica* (2) y *B. edulis* (4) extraídos con etanol. De igual forma, se puede observar la presencia de metabolitos de mediana polaridad al ser revelados a 254 nm de magnitud de luz UV (Fig. 27 A), con mayor intensidad en los hongos *R. deica* (1) y *B. edulis* (3) y *A. rubescens* (7) extraídos con metanol, y con menor intensidad en los hongos *B. edulis* (4), *T. floccosus* (5 y 6) y *A. rubescens* (8), lo contrario a la ausencia de metabolitos de mediana polaridad en los hongos *R. delica* (2) y *P. lenta* (10) extraídos con etanol.

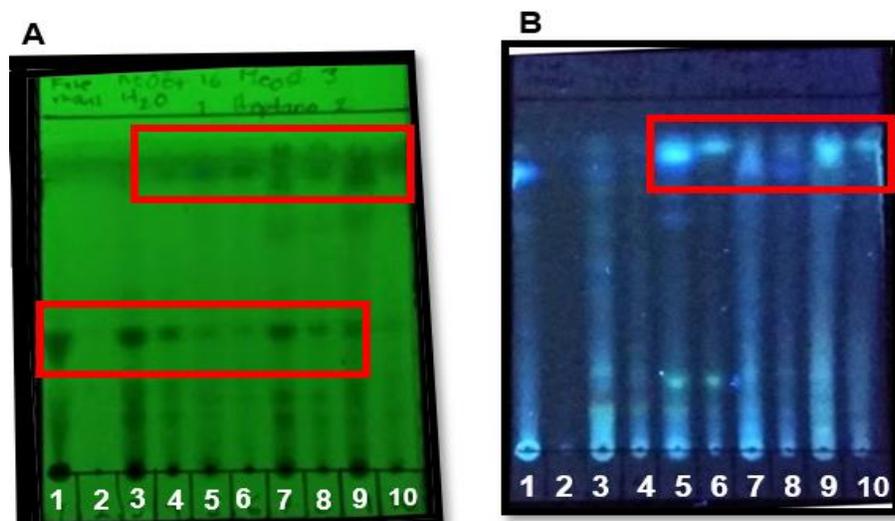


Figura 27. Cromatografía en capa fina con fase móvil: AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2). Observada con luz UV a una intensidad de onda de 254 nm (A) y 365 nm (B)

7.2.1 TLC con revelador para compuestos fenólicos

La TLC fase móvil AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2) para flavonoides (Fig. 28) mostró una banda de alta polaridad, se puede observar una mayor concentración de estos compuestos en los hongos *T. floccosus* en ambos disolventes (5 y 6) y *P. lenta* extraído con metanol (9), así como la presencia de estos, pero con una menor concentración en los hongos *R. delica* (1), *B-edulis*, (3), *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (10) y una ausencia total de flavonoides en el extracto del hongo *R. delica* (2) y en el extracto del hongo *P. lenta* ambos extraídos con etanol (10).

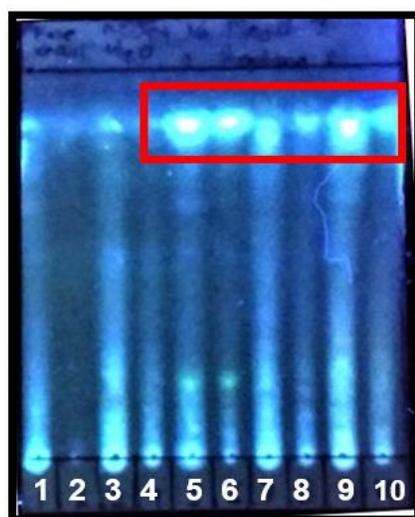


Figura 28. Cromatografía en capa fina con fase móvil: AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2). Revelado colorimétrico para flavonoides con Tricloruro de aluminio al 10% observado con luz UV a 365nm

7.2.2 TLC con revelador para actividad antioxidante

La actividad antioxidante que muestra la TLC AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2) (Fig. 29), se puede observar en dos bandas, la primera presentó compuestos de alta polaridad en los extractos de los hongos *T. floccosus* (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9 y 10) en ambos disolventes, en la segunda banda se observaron compuestos de mediana polaridad con actividad antioxidante en el extracto de los hongos, *R. delica* (1 y 2), *B. edulis* (3 y 4), *T. floccosus*, (5 y 6), *A. rubescens* (7 y 8) extraídos con ambos disolventes y *P. lenta* (9) extraído con metanol y la ausencia total de compuestos con actividad antioxidante se mostró en el extracto del hongo *P. lenta* extraído con etanol (10).

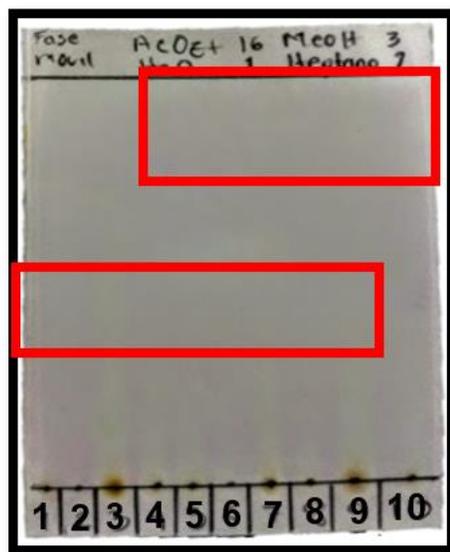


Figura 29. Cromatografía en capa fina con fase móvil: AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2). Revelado colorimétrico para actividad antioxidante con el método de detección 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH)

7.2.3 TLC con revelador para otros compuestos

En la Figura 30, se puede observar 2 revelaciones, el primer revelado es para terpenos, isoprenoides y saponinas (A), resaltando la presencia de dichos compuestos en 2 bandas diferentes, la primera banda mostró compuestos de alta polaridad en mayor concentración en los extractos de *A. rubescens* (7 y 8) y *P. lenta* (9 y 10) extraídos con ambos disolventes y en menor concentración en los extractos de los hongos *B. edulis* (3 y 4), *T. floccosus* (5 y 6), la segunda banda mostró compuestos de baja polaridad en los hongos *B. edulis* (3) extraído con metanol, *A. rubescens* (7 y 8) extraídos con ambos disolventes y *P. lenta* extraído con metanol (9) con mayor intensidad y con menor intensidad el extracto de *B. edulis* (4) extraído con etanol y *T. floccosus* (5 y 6), extraídos con ambos compuestos, así como la completa ausencia de estos compuestos en los extractos del hongo *R. delica* extraídos con ambos disolventes (1 y 2).

El segundo revelado es para alcoholes, aldehídos, compuestos insaturados, aminas y sulfoxidos con el método de detección de permanganato de potasio (KMnO₄) (B) mostrando la presencia

de estos compuestos con alta polaridad presentes con mayor intensidad en los hongos *A. rubescens* (7 y 8) extraídos con ambos disolventes y *P. lenta* (9) extraído con metanol y con menor intensidad en el hongo *B. edulis* extraído con metanol (3), así como la ausencia de estos compuestos en los hongos *R. delicia* (1 y 2) extraídos con ambos disolventes, *B. edulis* extraído con etanol (4), y *T. floccosus* extraído con ambos disolventes (5 y 6).

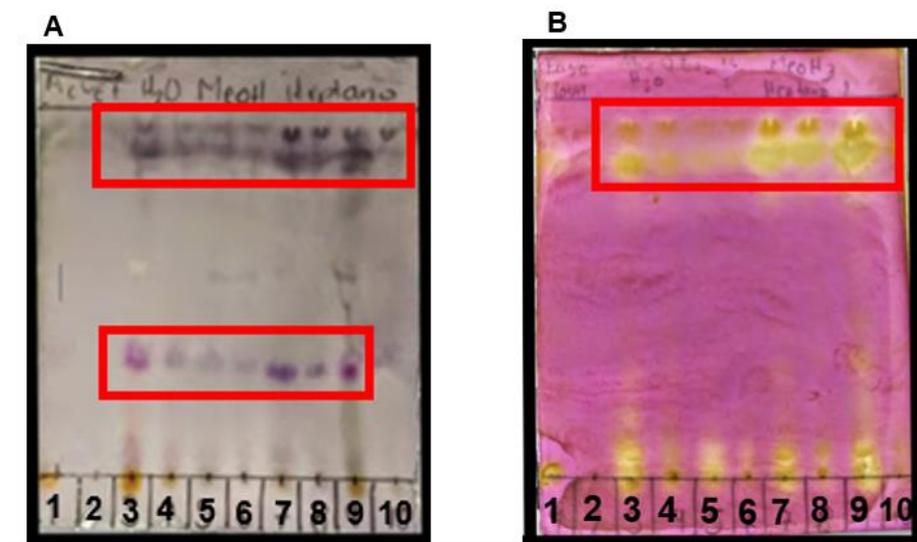


Figura 30. Cromatografía en capa fina con fase móvil: AcOEt, H₂O, MeOH, Heptano (16:1:3:2). Revelado colorimétrico para compuestos terpenos, isoprenoides y saponinas, con método de detección de Vainillina y revelado colorimétrico para alcoholes, aldehídos, compuestos insaturados, aminas y sulfóxidos con el método de detección de permanganato de potasio (KMnO₄) (B)

7.3 Análisis colorimétrico

En la figura 31, observamos que el extracto metanólico de *B. edulis* presentó la mayor concentración de fenoles totales, este extracto presentó diferencias significativas con todos los extractos metanólicos de las diferentes especies de hongos. Los extractos metanólicos de *R. delicia*, y *P. lenta* presentaron diferencias significativas con los demás extractos metanólicos,

pero no hubo diferencias entre ambos, los extractos metanólicos de *T. floccosus* y *A. rubescens* presentaron diferencias significativas con el resto de los extractos metanólicos, sin embargo, entre ellos, no hubo diferencias.

En los extractos etanólicos, la mayor concentración de polifenoles se obtuvo en el extracto de *R. delica*, este extracto presentó diferencias significativas con el resto de los extractos etanólicos, al igual que el extracto etanólico de *B. edulis*. Los extractos etanólicos de *T. floccosus*, *A. rubescens* y *P. lenta* no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero si con los extractos etanólicos de *R. delica* y *B. edulis*.

En la comparación de los dos extractos pertenecientes a la misma especie, los extractos de *R. delica* presentaron diferencias significativas entre ellos, de igual manera los extractos de *B. edulis* presentan diferencias significativas entre ambos, así como ambos extractos de *P. lenta* también presentaron diferencias significativas. Los dos extractos de *T. floccosus* y *A. rubescens* no presentaron diferencias significativas, respectivamente.

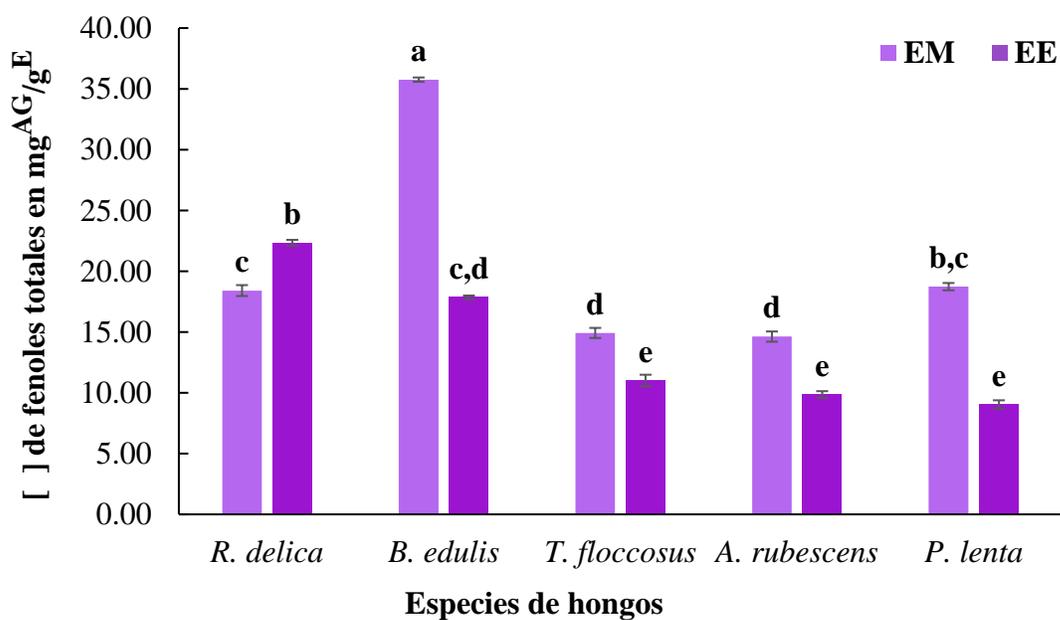


Figura 31. Concentración de fenoles totales en extractos metanólicos (EM) y extractos etanólicos (EE) de diferentes especies de hongos silvestres comestibles. Extractos con letras diferentes (a, b, c, d, e) muestran una diferencia significativa ($P < 0.001$).

En la figura 32, observamos que el extracto metanólico de *B. edulis* contenía la mayor concentración de flavonoides, presentó diferencias significativas con todos los extractos metanólicos de las diferentes especies de hongos. Los extractos metanólicos de *R. delica*, *A. rubescens* y *T. floccosus* no presentaron diferencias significativas entre ellos. El extracto metanólico de *P. lenta* no presentó diferencias con el extracto metanólico de *T. floccosus*, pero si presentó diferencias significativas con el resto de los extractos metanólicos. En los extractos etanólicos, la mayor concentración de flavonoides se obtuvo en el extracto de *T. floccosus* y este presentó diferencias significativas con el resto de los extractos etanólicos. El extracto etanólico de *P. lenta* no presenta diferencias con los extractos etanólicos de *R. delica* y *A. rubescens*, y los extractos etanólicos de *R. delica*, *B. edulis* y *A. rubescens* no presentó diferencias entre ellos. En la comparación de ambos extractos pertenecientes a la misma especie, si se encontraron diferencias significativas en los extractos de *B. edulis*, *T. floccosus* y *P. lenta*. Los extractos de *R. delica* y *A. rubescens* no presentan diferencias respectivamente.

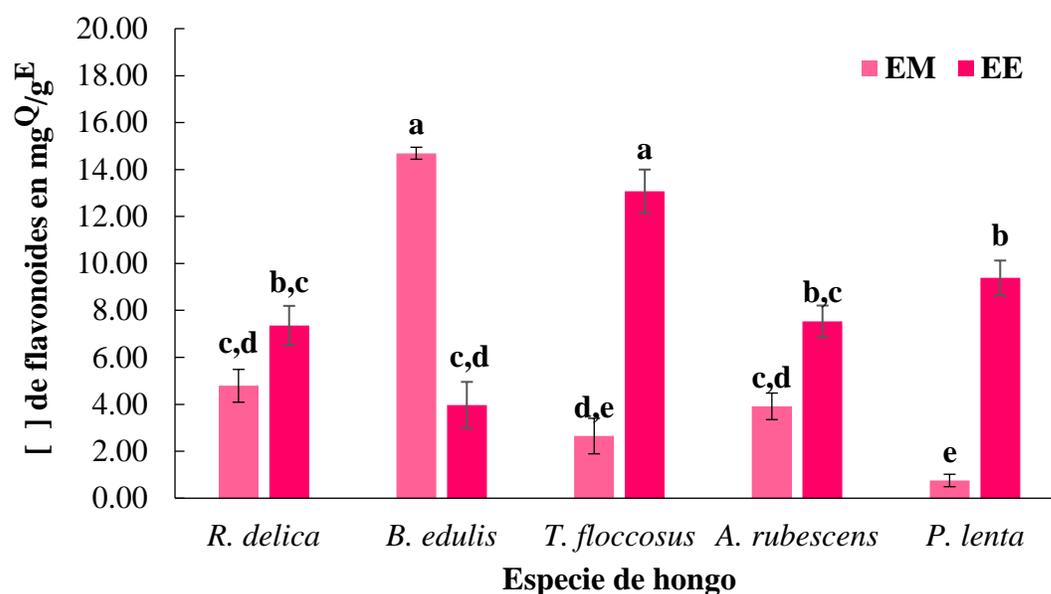


Figura 32. Concentración de flavonoides en extractos metanólicos (EM) y extractos etanólicos (EE) de diferentes especies de hongos silvestres comestibles. Extractos con letras diferentes (a, b, c, d, e) muestran una diferencia significativa ($P < 0.001$)

En la figura 33, observamos que el extracto metanólico de *B. edulis* mostró la mayor concentración de polifenoles, este extracto presentó diferencias significativas con todos los extractos metanólicos de las diferentes especies de hongos, los extractos metanólicos de *T. floccosus* y *A. rubescens* también presentaron diferencias significativas con los demás extractos metanólicos, de igual forma, los extractos metanólicos de *R. delica* y *P. lenta* presentaron diferencias significativas con el resto de los extractos, pero no entre ellos.

En los extractos etanólicos, la mayor concentración de polifenoles se obtuvo en el extracto de *R. delica*. Los extractos etanólicos de *R. delica*, *B. edulis*, *T. floccosus*, *A. rubescens* y *P. lenta* si presentaron diferencias significativas entre ellos, sin embargo, estos dos últimos no presentaron diferencias entre ambos.

En la comparación de ambos extractos pertenecientes a la misma especie, todos presentaron diferencias significativas.

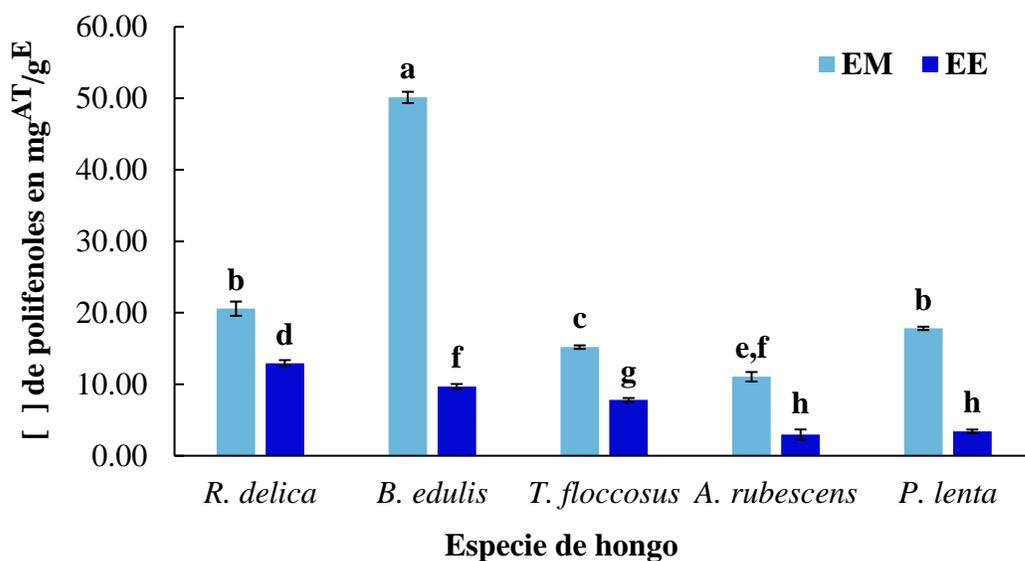


Figura 33. Concentración de polifenoles en extractos metanólicos (EM) y etanólicos (EE) de diferentes especies de hongos silvestres comestibles. Extractos con letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g, h) muestran una diferencia significativa ($P < 0.001$)

En la figura 34, se pueden observar las curvas dosis respuesta de la actividad antioxidante del extracto metanólico (A) y etanólico (B) del hongo *R. delica*, al graficar el % de inhibición y el logaritmo de las concentraciones utilizadas, obtuvimos la concentración inhibitoria 50 (IC50) de cada extracto; en el extracto metanólico se utilizaron concentraciones que van de los 4000 a 5200 ppm, obteniendo el IC50 a una concentración de 4629 ppm. Para el extracto etanólico, se utilizó un rango de concentración de 6500 a 8500 ppm, el IC50 se obtuvo a una concentración de 7401 ppm de extracto.

7.4 Actividad antioxidante por el método DPPH

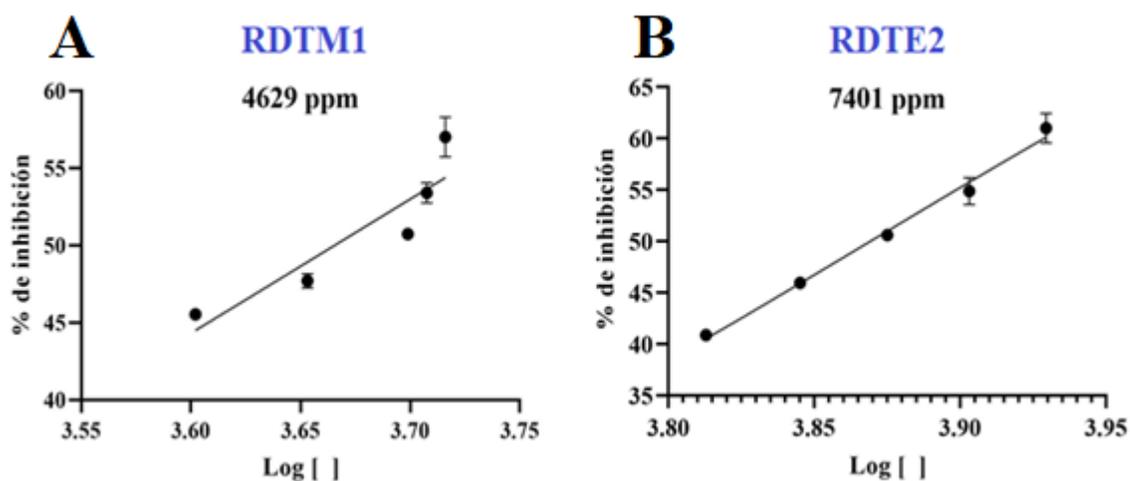


Figura 34. Curva dosis respuesta de la actividad antioxidante del extracto metanólico (A) y etanólico (B) de *R. delica* por el método DPPH.

En la figura 35 C, se observa la curva dosis respuesta de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *B. edulis*, al graficar el % de inhibición y el logaritmo de las concentraciones que están en un rango de 900 a 1750 ppm de extracto, se obtuvo que el IC50 se obtiene a una concentración de 1152 ppm. A diferencia del extracto etanólico (D) en donde se utilizaron concentraciones que van de los 2300 a los 2700 ppm, la IC50 se obtuvo a una concentración de 2432 ppm de extracto.

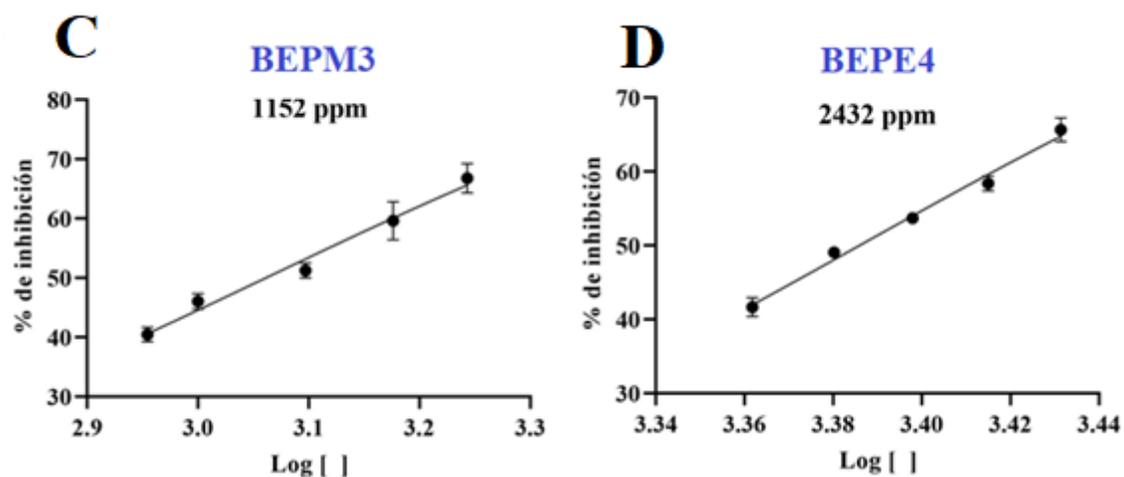


Figura 35. Curva dosis respuesta de la actividad antioxidante del extracto metanólico (C) y etanólico (D) de *B. edulis* por el método DPPH.

La figura 36 E, muestra la curva dosis respuesta del extracto metanólico de *T. floccosus*, resultado de graficar el % de inhibición y el logaritmo de las concentraciones utilizadas para obtener el IC50, el rango de concentración fue de 2500 a 3500 ppm de extracto, teniendo como resultado que a una concentración de 2862 ppm se obtiene el IC50. Para el extracto etanólico (F), se utilizó un rango de concentración que va de 3000 a 4000 ppm y se obtuvo la IC50 a una concentración de 3466 ppm.

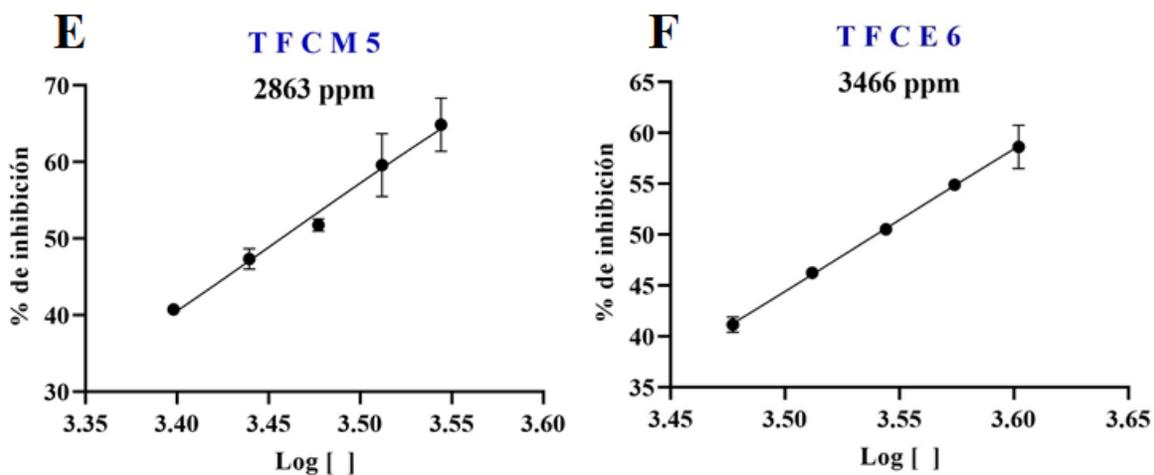


Figura 36. Curva dosis respuesta de la actividad antioxidante del extracto metanólico (E) y etanólico (F) de *T. floccosus* por el método DPPH.

En la figura 37, se indica la IC50 del extracto metanólico (G) y etanólico (H) del hongo *A. rubescens* que se obtuvo al graficar el % de inhibición y el logaritmo de la concentración utilizada de cada extracto. Para el extracto metanólico se utilizó un rango de concentración que va de 3500 a 4500 ppm obteniendo el IC50 a una concentración de 3877 ppm. Para el extracto etanólico se utilizó un rango de concentración de 4500 a 5500 ppm alcanzando el IC50 a una concentración de 4929 ppm de extracto.

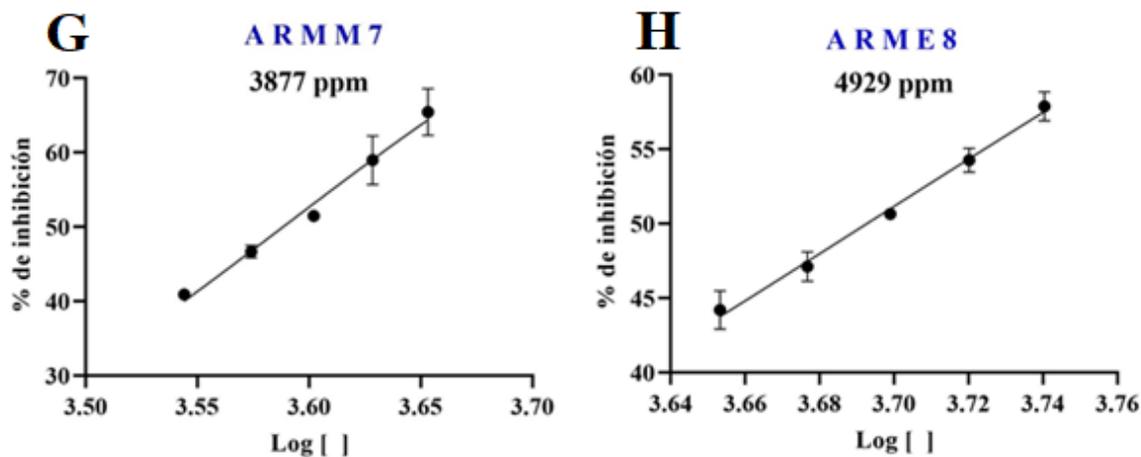


Figura 37. Curva dosis respuesta de la actividad antioxidante del extracto metanólico (G) y etanólico (H) de *A. rubescens* por el método DPPH.

En la figura 38, se observa la IC50 del extracto metanólico (I) y etanólico (J) del hongo *P. lenta* que se obtuvo al graficar el % de inhibición y el logaritmo de la concentración utilizada de cada extracto. Para el extracto metanólico se utilizó un rango de concentración que va de 2200 a 2600 ppm obteniendo el IC50 a una concentración de 2378 ppm. Para el extracto etanólico se utilizó un rango de concentración de 3500 a 4200 ppm alcanzando el IC50 a una concentración de 3901 ppm de extracto.

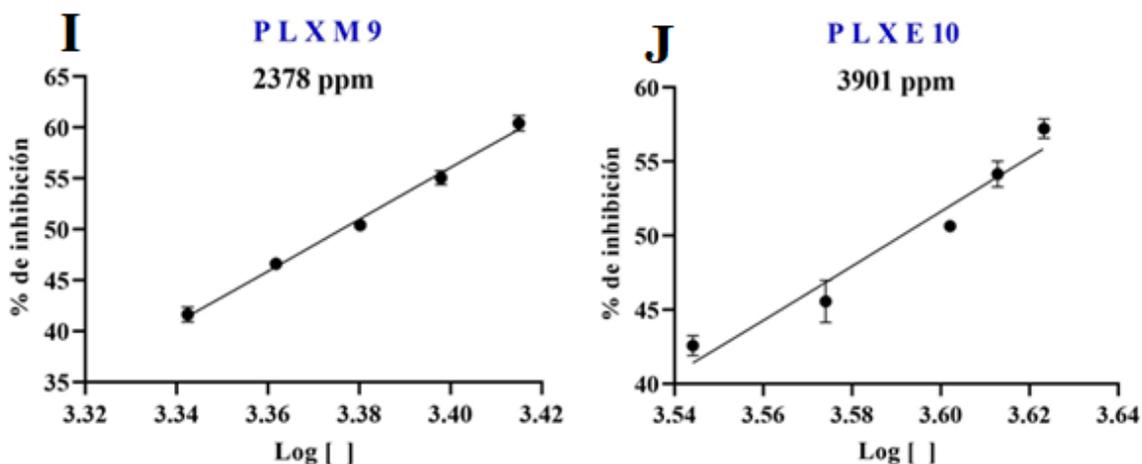


Figura 38. Curva dosis respuesta de la actividad antioxidante del extracto metanólico (I) y etanólico (J) de *P. lenta* por el método DPPH.

En la figura 39, se observa que el extracto metanólico de *B. edulis* (BEPM3) presenta la concentración de extracto más baja necesaria para inhibir o estabilizar el 50% del radical DPPH o IC50, con una concentración correspondiente a 1151 mg/L de extracto, presenta diferencias significativas con todos los extractos con un valor de significancia ($P < 0.001$). El extracto metanólico de *P. lenta* (PLXM9), inhibe el 50% del radical a una concentración de 2378 mg/L de extracto, presenta diferencias significativas con el resto de los extractos. El extracto etanólico

de *B. edulis* (BEPE4) para obtener el IC50, utiliza una concentración de 2432 mg/L, más de la mitad que el extracto metanólico de la misma especie, igual que los extractos antes mencionados, presenta diferencias significativas con el resto de los extractos. Para el extracto metanólico (TFCM5) y etanólico (TFCE5) de *T. floccosus* se requiere una concentración de 2863 mg/L y 3466 mg/L de extracto respectivamente para estabilizar el 50% del radical DPPH, presentan diferencias significativas entre ambos y el resto de los extractos. El extracto metanólico de *A. rubescens* y el extracto etanólico de *P. lenta* (PLXE10), alcanzan el IC50 a una concentración de 3877 mg/L y 3901 mg/L de extracto, no presentan diferencias significativas entre ellos, pero sí presentan diferencias significativas con el resto de los extractos. El extracto metanólico de *R. delica* (RDTM1) necesita una concentración de 4629 mg/L para inhibir el 50 % del radical DPPH, presenta diferencias significativas con el resto de los extractos. Para el extracto etanólico de *A. rubescens* (ARME8) se requirió una concentración de 4629 mg/L de extracto para obtener el IC50, presento diferencias significativas con el resto de los extractos. Por último, el extracto etanólico de *R. delica* necesita una concentración de 7401mg/L para poder inhibir el 50% del radical DPPH.

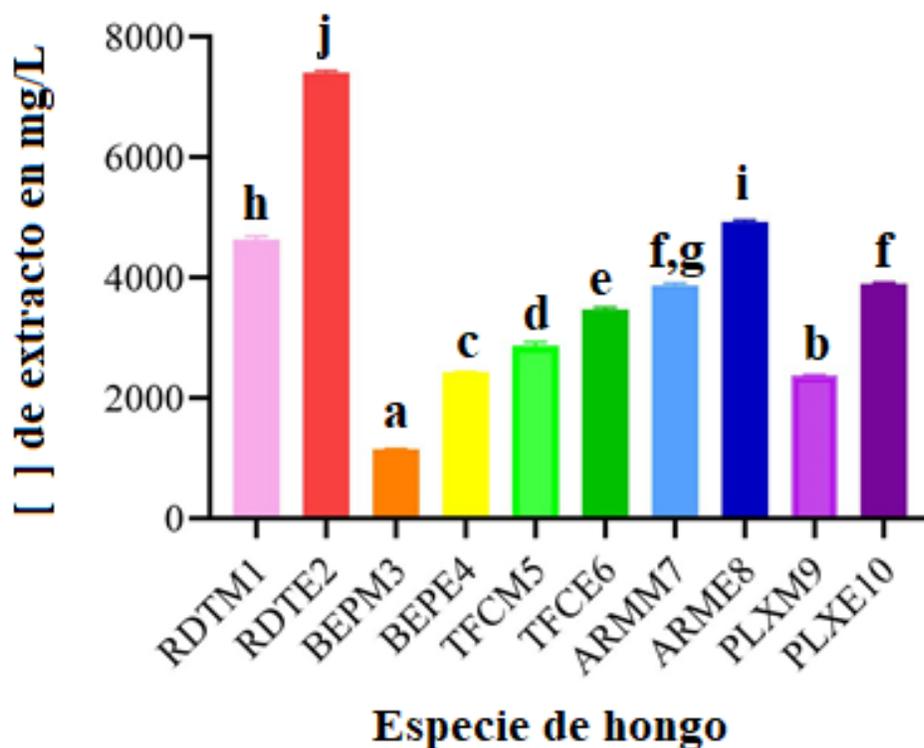


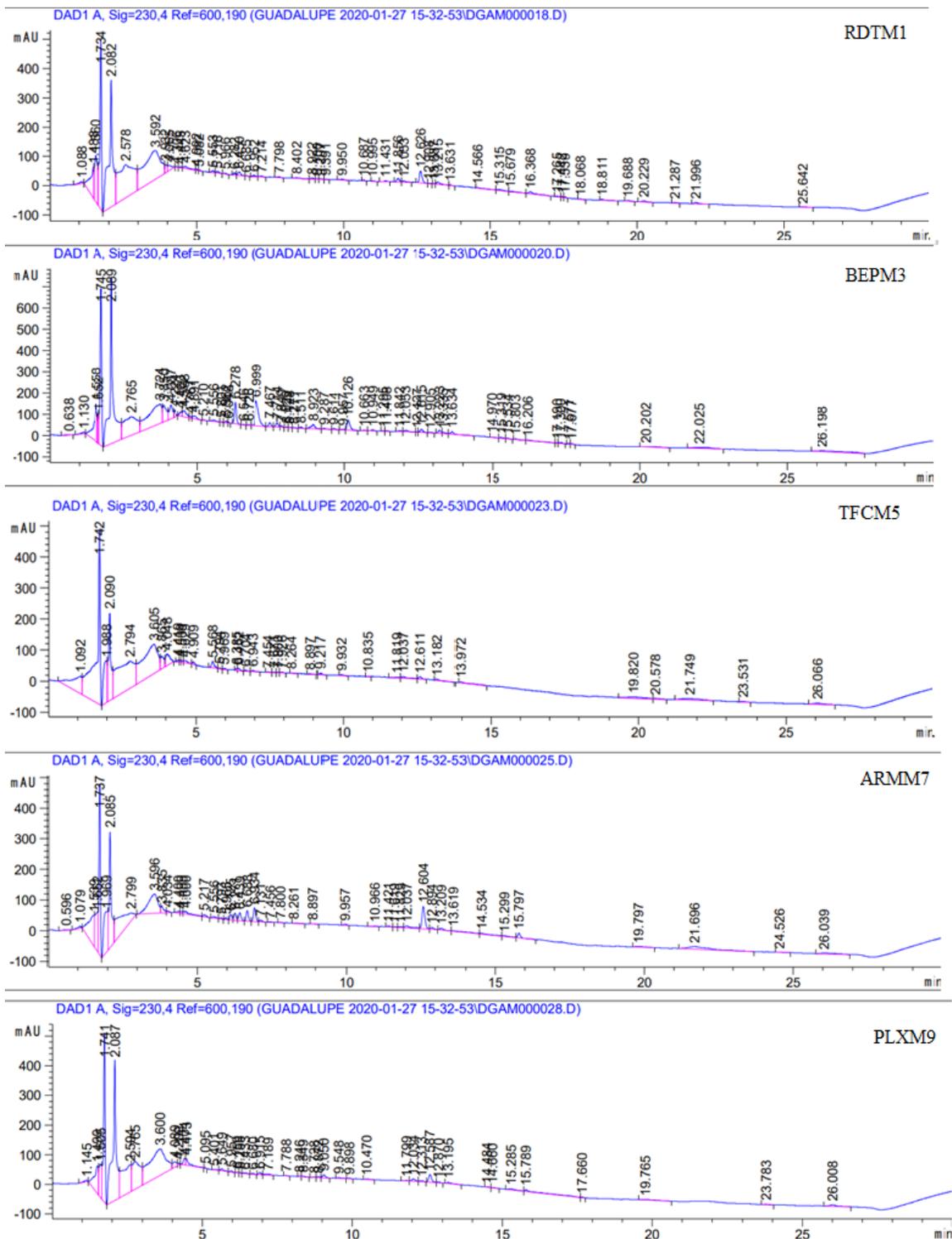
Figura 39. Concentración de extractos metanólicos y etanólicos con actividad antioxidante de diferentes especies de hongos silvestres comestibles. Extractos con letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j) muestran una diferencia significativa ($P < 0.001$).

7.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

7.5.1 Cromatografías de extractos metanólicos y etanólicos con una longitud de onda de 230 nm.

En la figura 40, se observan los cromatogramas de los extractos metanólicos, leídos a una longitud de onda de 230 nm. En el extracto de *B. edulis* (BEPM3) se obtuvo un total de 60 tiempos de retención diferentes, que corresponden a diferentes compuestos. Seguido del extracto de *R. delica* (RDTM1) con 53 diferentes tiempos de retención, los extractos de *A. rubescens* (ARMM7) y *P. lenta* (PLXM9) mostraron 45 diferentes tiempos de retención y el extracto de

T. floccosus (TFCM5) mostró un total de 30 diferentes tiempos de retención. En todos los extractos resaltan principalmente 2 tiempos de retención que van del minuto 1.7 al minuto 2. 1, se encuentran entre los 100 a las 700 mil unidades de absorbancia.



En la figura 41, se observan los cromatogramas de los extractos etanólicos, leídos a una longitud de onda de 230 nm. En el extracto de *B. edulis* (BEPE4) se obtuvo un total de 62 tiempos de retención diferentes, que corresponden a diferentes compuestos. Seguido del extracto de *T. floccosus* (TFCE6) con 57 diferentes tiempos de retención, el extracto de *R. delica* (RDTE2) mostro 56 diferentes tiempos de retención y los extractos de *A. rubescens* (ARME8) y *P. lenta* (PLXE10) mostraron 45 diferentes tiempos de retención. En todos los extractos resaltan principalmente 2 tiempos de retención que van del minuto 1.7 al minuto 2. 1, se encuentran entre los 100 a los 700 mil unidades de absorbancia.

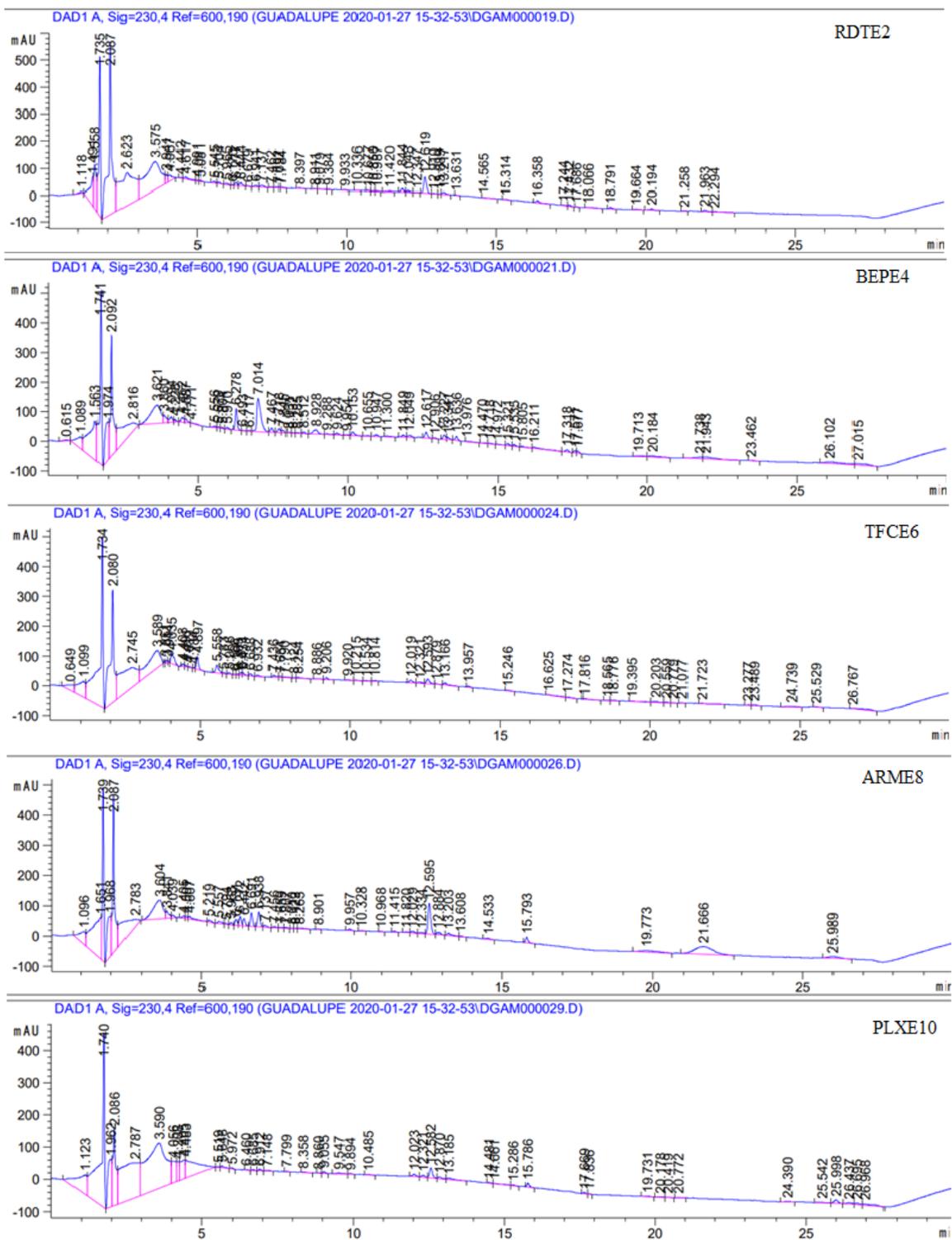


Figura 41. Cromatogramas de los extractos etanólicos a una longitud de onda de 230 nm.

7.5.2 Cromatografías de extractos metanólicos y etanólicos con una longitud de onda de 253 nm.

En la figura 42 se observan los cromatogramas de los extractos metanólicos, leídos a una longitud de onda de 253 nm. En el extracto de *B. edulis* (BEPM3) se obtuvo un total de 51 tiempos de retención diferentes, que corresponden a diferentes compuestos. Seguido de los extractos de extracto de *R. delica* (RDTM1) y *P. lenta* (PLXM9) con 42 diferentes tiempos de retención, el extracto de *A. rubescens* (ARMM7) mostró 39 diferentes tiempos de retención y el extracto de *T. floccosus* (TFCM5) mostró un total de 33 diferentes tiempos de retención. En todos los extractos resaltan principalmente 1 tiempo de retención que oscila entre el minuto 2 y 2.1, entre los 700 y 1500 mil unidades de absorbancia.

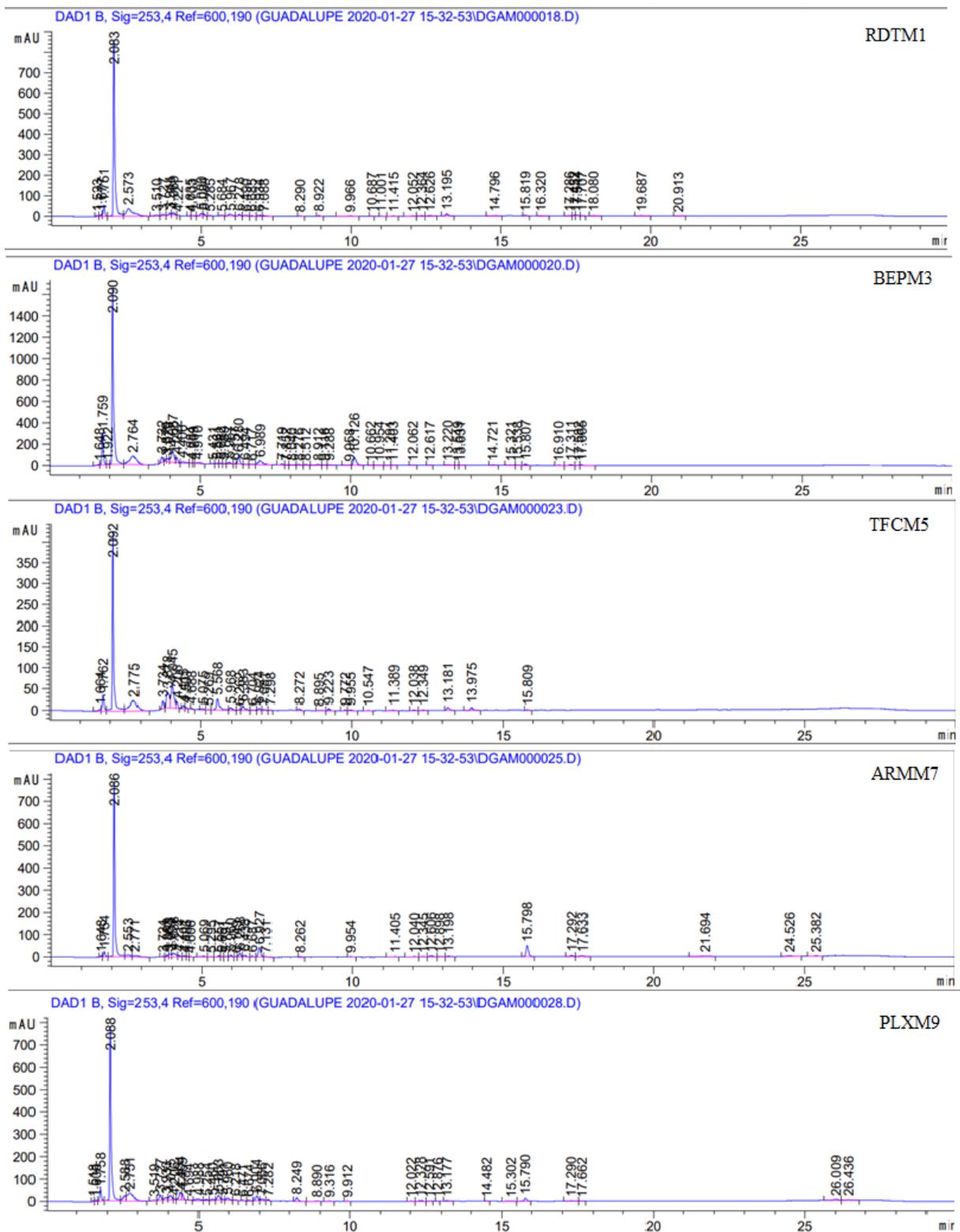


Figura 42. Cromatogramas de los extractos metanólicos a una longitud de onda de 253nm.

En la figura 43, se observan los cromatogramas de los extractos etanólicos, leídos a una longitud de onda de 253 nm. En el extracto de *B. edulis* (BEPM4) se obtuvo un total de 53 tiempos de retención diferentes, que corresponden a diferentes compuestos. Seguido del extracto de extracto de *R. delica* (RDTM2) con 48 diferentes tiempos de retención, el extracto de *T. floccosus* (TFCM6) mostró 45 diferentes tiempos de retención y los extractos de *A. rubescens* (ARMM8) y *P. lenta* (PLXM10) mostraron un total de 43 diferentes tiempos de retención. En todos los extractos resaltan principalmente 1 tiempo de retención que oscila entre el minuto 2 y 2.1, entre los 700 y 1500 mil unidades de absorbancia.

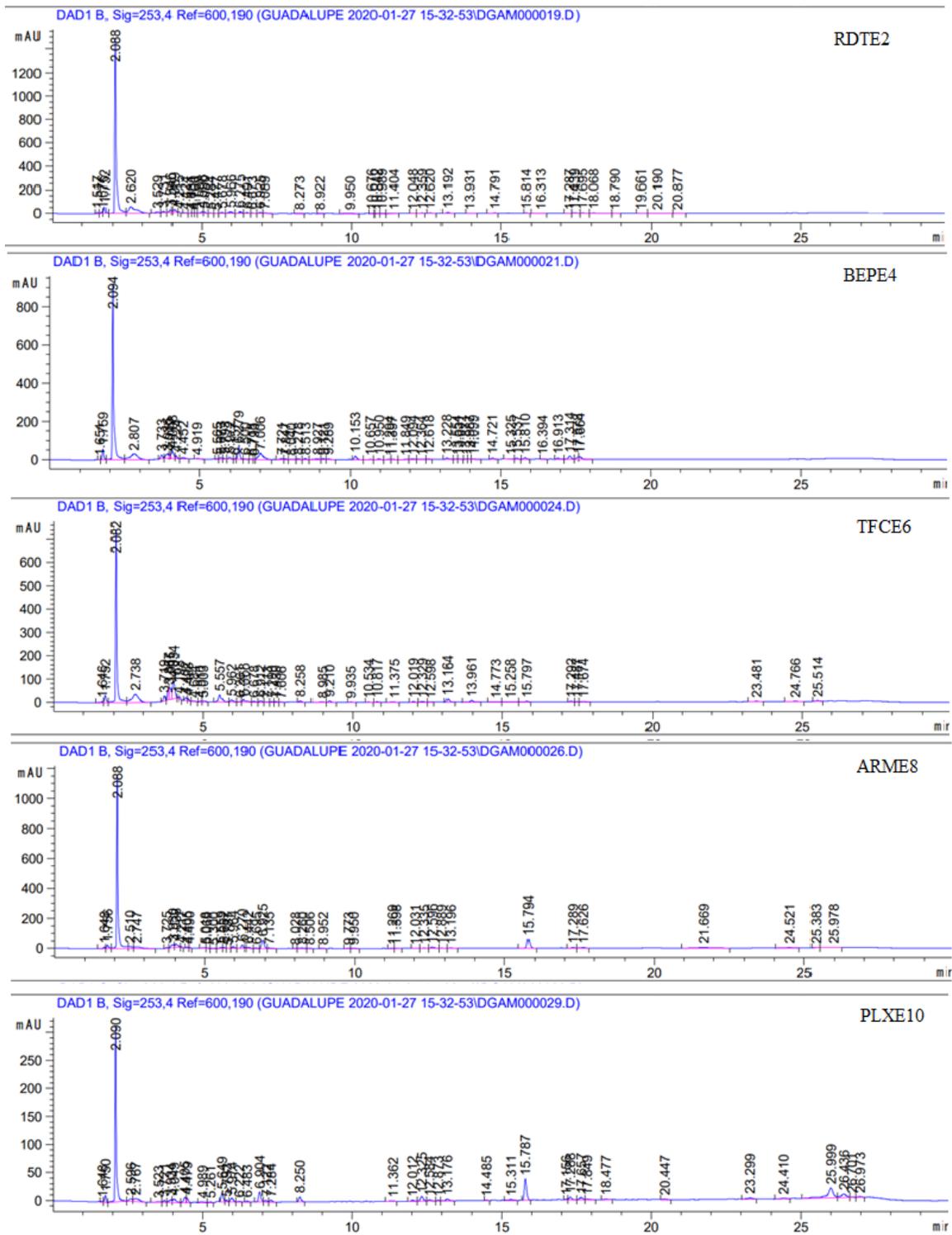


Figura 43. Cromatogramas de los extractos etanólicos a una longitud de onda de 253nm.

7.5.3 Cromatografías de extractos metanólicos y etanólicos con una longitud de onda de 290 nm.

En la figura 44, se observan los cromatogramas de los extractos metanólicos, leídos a una longitud de onda de 230 nm. En el extracto de *B. edulis* (BEPM3) se obtuvo un total de 53 tiempos de retención diferentes, que corresponden a diferentes compuestos. Seguido del extracto de *R. delica* (RDTM1) con 45 diferentes tiempos de retención, el extracto de *P. lenta* (PLXM9) mostró 44 diferentes tiempos de retención, el extracto de *A. rubescens* (ARMM7) arrojó 41 diferentes tiempos de retención y el extracto de *T. floccosus* (TFCM5) mostró un total de 33 tiempos de retención. En todos los extractos resaltan una mayor diversidad de concentración de compuestos con tiempos de retención más prolongados.

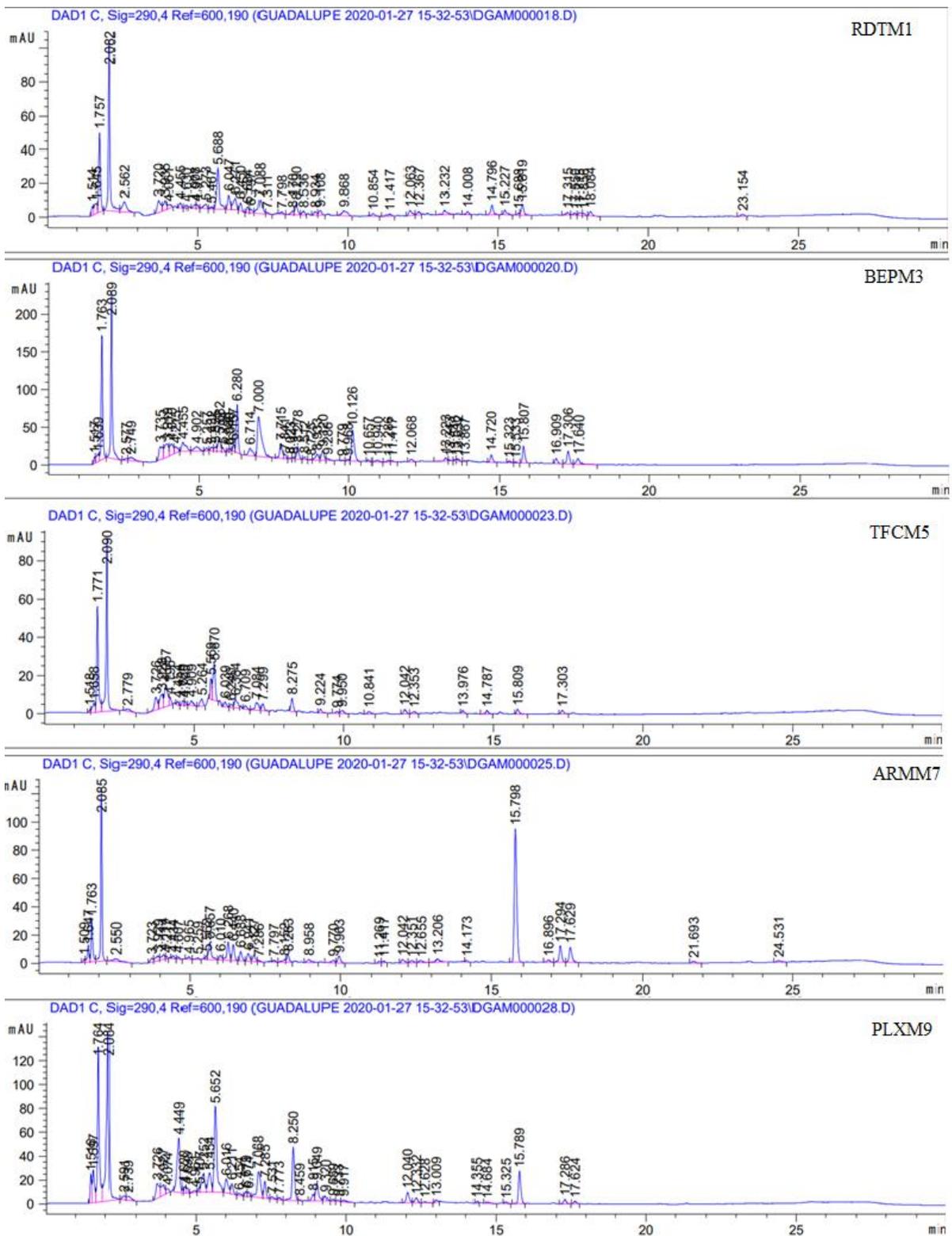


Figura 44. Cromatogramas de los extractos etanólicos a una longitud de onda de 253nm.

En la figura 45, se observan los cromatogramas de los extractos metanólicos, leídos a una longitud de onda de 230 nm. En el extracto de *B. edulis* (BEPE4) se obtuvo un total de 58 tiempos de retención diferentes, que corresponden a diferentes compuestos. Seguido del extracto de *T. floccosus* (TFCE6) con 48 diferentes tiempos de retención, los extractos de *R. delica* (RDTE2) y *P. lenta* (PLXE10) mostraron 45 diferentes tiempos de retención y el extracto de *A. rubescens* (ARME8) mostro 45 diferentes tiempos de retención. En todos los extractos resaltan una mayor diversidad de concentración de compuestos con tiempos de retención más prolongados.

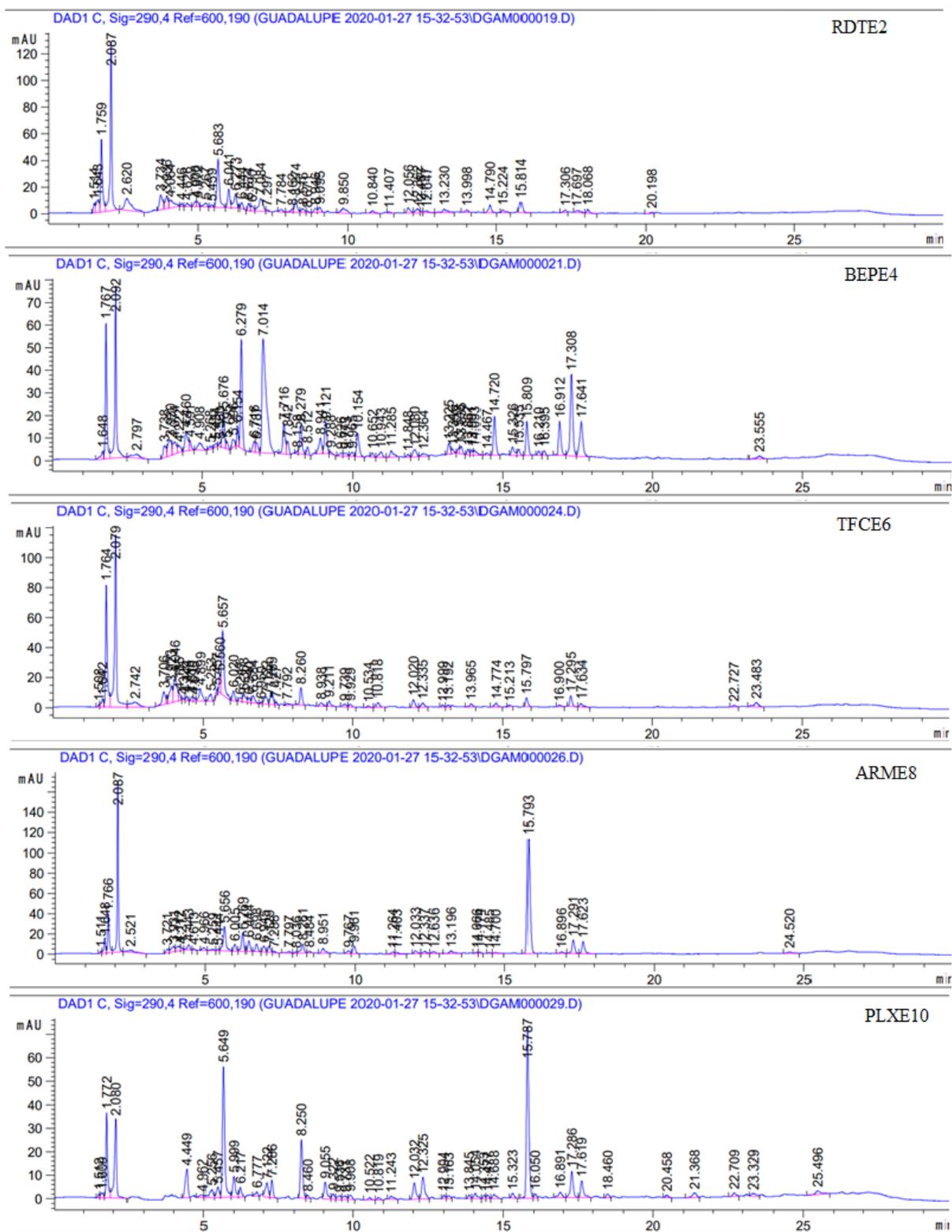


Figura 45. Cromatogramas de los extractos etanólicos a una longitud de onda de 253nm.

8. DISCUSIÓN

8.1. Extracción de compuestos bioactivos

Ramírez-Anguiano (2009) extrajo compuestos con actividad biológica de *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Amanita caesarea*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius* y *Lactarius deliciosus*, reportó que los extractos acuosos tienen un mayor rendimiento de extracción, seguido de los extractos metanólicos y los extractos etéreos, observaron que de los extractos acuosos, *A. bisporus* presentó el mayor rendimiento de extracción (302.50 mg/g peso seco), para los extractos metanólicos y etéreos, *A. caesarea* presentó el mayor rendimiento de extracción con 170 y 62.90 mg/g peso seco respectivamente. De igual manera, los resultados obtenidos en esta investigación reportan que los mejores resultados de extracción para los hongos *R. delica*, *B. edulis*, *T. floccosus*, *A. rubescens* y *P. lenta*, se obtienen cuando se utiliza metanol como disolvente de extracción, siendo *R. delica* quien obtuvo el mayor rendimiento de extracción con 22.75% peso seco, en los extractos etanólicos, *B. edulis* presentó el mayor rendimiento de extracción con 19.06% peso seco. Adjunto a los resultados previamente mencionados, en esta investigación, también se reportan el contenido de flavonoides y polifenoles presentes en los extractos de cada hongo, se observó un mayor contenido de compuestos de naturaleza fenólica (fenoles totales, flavonoides y polifenoles) en los extractos metanólicos de *B. edulis*. Hsiao-Wen y cols. (2019) extrajeron compuestos con actividad biológica de cascaras de *Chenopodium formosanum*, utilizando como disolventes; agua: alcohol (30:70) y agua: etanol al 70%, (30:70), obteniendo como resultados, un mayor rendimiento de extracción en los extractos que contiene etanol al 70% obteniendo un rendimiento del 17.1% de compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles totales). Los resultados antes mencionados, al igual que los reportados en esta investigación, muestran, que la mayor concentración de compuestos fenólicos se obtiene cuando se hace una extracción con disolventes de alta polaridad, como el agua, metanol o el etanol, debido a que los compuestos fenólicos poseen un gran número de grupos hidroxilos o azúcares que son solubles en disolventes de alta polaridad (Pérez y cols. 2013).

8.2. Identificación de compuestos bioactivos

Ramírez-Anguiano (2009) utilizó la cromatografía en capa fina como método preliminar para separar y detectar compuestos con actividad antioxidante, para ello, utilizó el método de detección DPPH, observó que todos los extractos metanólicos presentaban actividad antioxidante, diferenciándose por la intensidad y/o minoría de coloración de las bandas, reportaron un factor de retención de 0.86 para las bandas con coloraciones más intensas, observaron que todos los extractos metanólicos presentaban actividad antioxidante. Así mismo Yang y cols. (2002) reportaron que algunas especies de hongos como *Lactarius deliciosus*, *Lentunula edodes*, y *Pleurotus ostreatus*, presentan una banda fina con un factor de retención de 0.91, lo que sugieren la presencia de α -tocoferol. Algo similar se reporta en esta investigación, ya que todos los extractos presentan actividad antioxidante y al igual que en el estudio antes mencionado, la actividad antioxidante depende de la intensidad de la banda y la polaridad del compuesto bioactivo.

8.3. Actividad antioxidante

La búsqueda de nuevos compuestos fenólicos con actividad antioxidante representa en la actualidad uno de los grandes retos en la micología aplicada, debido a que existe poca información sobre la actividad antioxidante de hongos silvestres en comparación con hongos cultivados (Palacios y cols. 20011). La mayoría de las investigaciones que determinan la actividad antioxidante de extractos metanólicos o etanólicos en hongos, emplea diferentes metodologías para medir este parámetro, como es el uso de los radicales DPPH, ABTS y FRAP, siendo la técnica de DPPH donde se muestra mayor sensibilidad para obtener el 50% de la inhibición del radical DPPH (Rusu y cols. 2019). Algo similar a lo reportado previamente es lo que se muestra en nuestra investigación donde se emplea la técnica de DPPH como metodología estándar para la cuantificación de la actividad antioxidante. Palacios y cols. Reportan la actividad antioxidante de extractos metanólicos y etanólicos del hongo *B. edulis*, estos autores muestran que el extracto con mayor actividad antioxidante fue el metanólico. Por otro lado, reportan la IC50 de extractos etanólicos de los hongos *Pleurotus tuber-regium*, *lentinula*

sqquarrosulus, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* y *Auricularia aurícula*, en donde la concentración de 2100 mg/L proveniente del hongo *A. aurícula* fue la menor concentración requerida para inhibir el 50% del radical DPPH, a diferencia de los otros hongos donde se requiere aproximadamente entre 3,680 y 17390 mg/L de cada extracto. Contradictoriamente a lo reportado en nuestra investigación el extracto metanólico del hongo silvestre *B. edulis* mostró un 50% de inhibición del radical DPPH a una concentración de 1151 mg/L, la mitad de la concentración reportada por Obodai y cols. 2014. Resultados similares a este trabajo es lo que reporta Elmastas y cols. 2007 donde la mayor actividad antioxidante se mostró en los extractos metanólicos de los hongos *Agaricus bisporus*, *Verpa conica* y *Boletus edulis*, siendo el hongo *B.edulis* el que mostró la mayor actividad antioxidante. Dentro de las principales moléculas responsables de la actividad antioxidante en hongos silvestres de manera específica para el hongo *B. edulis* se ha reportado la presencia de ácido cafeico, clorogénico, cumárico, gálico, gentísico, hidroxibenzoico y protocatequico, además de la miricetina (Palacios y cols. 2011). Sin embargo, la producción de estas moléculas está sujeta a diversas variables ambientales como son, el tipo de especie, sustrato, condiciones ambientales como, actividad de agua, pH y temperatura (Filipa y cols. 2011). Además de que el ácido cafeico y gálico son eficientes moléculas antioxidantes, de igual forma se conoce su potente actividad anticancerígena, antiinflamatoria, hepatoprotectora, neuroprotectora y analgésica, por lo que el uso de extractos metanólicos del hongo *B. edulis* podrían ser empleados para la formulación de nutraceuticos que permitan prevenir o combatir patologías. Pero se requiere de más investigación para conocer cuál podría ser el efecto toxico subagudo y agudo de estos extractos.

9. CONCLUSIONES

Al utilizar disolventes específicos para polaridad como el metanol y etanol, se logró la extracción de compuestos polares como los fenoles (fenoles totales, flavonoides y polifenoles), para corroborar la presencia de compuestos polares se utilizó una cromatografía en capa fina Silica gel 60 con fase móvil AcOet, H₂O, MeOH y Heptano (16:1:3:2), ya que esta fase móvil tiene un espectro de polaridad amplio y específico, en todas las extracciones se observó específicamente la presencia de compuestos polares. Debido a que el metanol tiene una mayor capacidad para formar puentes de hidrogeno o fuerzas dipolo-dipolo, la mayor concentración de fenoles totales, flavonoides y polifenoles se obtuvieron en el extracto metanólico de *B. edulis*. Una característica de los compuestos fenólicos es que poseen propiedades antioxidantes, para inhibir el 50% de radicales libres se utilizó una concentración mínima inhibitoria de 1152 mg/L utilizando el extracto metanólico de *B. edulis*.

Estos resultados sustentan que el hongo *B. edulis* en comparación con los demás hongos es el que contiene mayor contenido de antioxidantes, esto debido a que tiene una mayor producción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante.

10. PERSPECTIVAS

- ✓ Caracterización de cada compuesto con actividad antioxidante.
- ✓ Realizar ensayos que muestren otras actividades biológicas como: antimicrobianas, antineoplásicas, antiinflamatorias y antiolesterémicas.
- ✓ Probar la eficacia de las moléculas en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- ✓ Realizar ensayos de toxicidad aguda y subaguda.
- ✓ Aplicación de los compuestos para la elaboración de suplementos alimenticios.

11. REFERENCIAS

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS y Suleria HA. 2017. Natural polyphenols: An overview. *Inter Jour of Food Proper*. 20(8): 1689-1699.
- Alexis Biochemicals. 2017. Polyphenols. Retrieved from www.alexisbiochemicals.com
- Álvarez EO. 2006. Diversidad y Abundancia de Macromicetos en el parque educativo San José Bocomtenelté, municipio de Zinacantán, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Ardo-López CE. 2007. La producción de los hongos comestibles. Tesis de Maestría en Docencia Universitaria con Especialidades en Evaluación Educativa. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Asatiani MD, Elisashvili V, Soungulashvili G, Reznick AZ y Wasser SP. 2010. Higher basidiomycetes mushroom as a source of antioxidants. *Scient Publi. India* 1: 311-326.
- Bautista-Nava E, Moreno-Fuentes A, Pulido MT, Valadez-Azúa R y Ávila R. 2010. Bases bioculturales para el aprovechamiento y conservación de los hongos silvestres comestibles en el municipio de Tenango de Doria, Hidalgo, México In: *Etnobiología y sistemas biocognitivos tradicionales: paradigmas en la conservación biológica y el fortalecimiento cultural*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/Asociación Etnobiológica Mexicana/Sociedad Latinoamericana de Etnobiología, Pachuca. pp. 226-230.
- Berra BD, Cortes IN, Fedeli E, Rasetti MF y Galli G. 1995. Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. *Food Agric Org Unites Nations*. 72:285-291.
- Cabarroi M, Maldonado S y Recio G. 2012. Catálogo de Hongos y Mixomycetes del Jardín Botánico Nacional de Cuba, Editorial Universitaria Cubana. Cuba.
- Cabrera S y Giacobone G. 2010. Monitoreo de líquenes como bioindicadores de contaminación. Agencia de Protección Ambiental, Ministerio de Ambiente y Espacio Público. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires.
- Calonge F. 2009. Guía de bolsillo para el buscador de setas. Mundi-Prensa. México.

- Carrillo L. 2003. Microbiología Agrícola. Universidad Nacional de Sunaltun, Argentina.
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol induced liver injury. *Arch Toxicol.* 83(6):519-48.
- Chu KT, Xia LX, Ng TB. 2005. Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides* 26(11):2098–2103.
- Clifford MN. 1992. Sensory and dietary properties of phenols. *Proceeding of the 16th international conference of grape polyphenol.* 16(11):18-23.
- CoteJ, Cillet S y DOyon G. 2010. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50(7):666–679.
- Cuesta J y Jiménez J. 2016. Ficha micológica. <http://www.amanitacesarea.com/russula-delica.html>.
- Decker EA. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev.* 55(1):396-398.
- Díaz-Barriga H. 1992. Hongos comestibles y venenosos de la cuenca del lago de Pátzcuaro, Michoacán. Centro de investigación y desarrollo del estado de México.
- Elsayed EA, Enshasy HE, Wadaan MAM y Aziz A. 2014. Mushroom; a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediat Inflamm* 1: 1-15.
- Eyssartier G, Masson-Dlaize I y Joly P. 2011. Setas. Servilibro. Madrid, España.
- Fernández. 2009. Fundamentos del análisis cromatográfico: Cromatografía de líquidos de alta resolución. Departamento de Ingeniería Química UPCT.
- Fisher M, Yang LX. 2002. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PKS): implications of cáncer immunotherapy. *Anticancer Res.* 22(3): 1737-1754.
- Franco MA, Vasco PE y López M. 2005. Macrohongos de la Región del Medio Caqueta-Colombia. CBS-Fungal diversity centre. Colombia.
- García JP, Pérez GS, Sánchez RJ y Valle GC. 2005. Setas de Salamanca. Ediciones de la Diputación de Salamanca Naturaleza y Medio ambiente. España.
- García RM. 2004. Manual para buscar setas. Ediciones Mundi-Prensa. 5ª Edición, Madrid, España.
- Garibay-Origel R, Caballero J, Estrada-Torres A y Cifuentes J. 2007. Understanding cultural significance, th edible mushrooms case. *Jour of Ethbiolgy and Enthnomed.* 3: 1-18.

- Guillamón S, García-Lafuente A, Lozano M. 2010. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 81(7): 715-723.
- Guzmán G, Medel R y Ramírez-Guillén F. 2009. Hongos. La diversidad Biológica del estado de México. Estudio de Estado. México: Gobierno del estado de México. 251-260.
- Guzmán G. 1994. Los hongos y líquenes en la medicina tradicional mexicana. Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana Vol III. Instituto Nacional Indigenista, México. 1427-1487.
- Guzmán G. 1998. Análisis cualitativo de la diversidad de los hongos en México.
- Herrera T y Guzmán G. 1961. Taxonomía y ecología de los principales hongos comestibles de diversos lugares de México. *An Inst Biol UNAM* 32: 33-135.
- Hilje Q, Araya F y Scorza R. 1991. Plagas y enfermedades forestales en América Central. Guía de Campo. Turrialba, Costa Rica. CATIE. Manuel técnico No. 4.
- Hsiao-Wen H, Ming-Ching C, Bang-Yunan C y Chung-Yi W. (2019). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, phenolic compounds, antioxidant and anti-tyrosinase activity of *Djulis Hull*. *J Follid Sci Technol*. 56(9): 4016-4024.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía en Informática (INEGI). Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas (DENUE)
- Ko JL, Hsu CT, Lin RH, Kao CL, Lin JY. 1995. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur J Biochem* 228:244-249.
- Koda Y, Shimizu M, Sonoda Y y Sato Y. 1989. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem Pharm Bull*. 37: 531-533.
- Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J y Petrovic P. 2015. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*. 20:19 489-525.
- Kühnau J. 1976. The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24:117-190.
- Lee W, Shin H, Hong J, Pyo H y Kim Y. 2010. Studies on the analysis of benzo (a) pyrene and its metabolites in biological samples by using high performance liquid chromatography/fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 24:1-7.

- Letan A. 1966. The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. *J Food Sci*, 31:518- 523.
- Liu QH, Wang HX y Ng TB. 2006. First report of a xylose-specific lectin with potent hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. *Biochim Biophys Acta*. 1760(12):1914–1919.
- Lock, O. 1988. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 1ª Edición, Lima, Perú.
- López CY, Guevara-Guerrero G y Alonso-Riverol JL. 2011. Hongos. Riqueza Biológica de Quintana Roo: Un análisis para su conservación. Colegio de la Frontera Sur (Ecosur)-Comisión Nacional de Quintana Roo, México. 23-29.
- López GO, Pérez ME, Hernández B, Sánchez SM, Gil-Martínez M, Calvo LM, Calonge F, Fernández D y Sánchez E. 2006. Guía de educación ambiental de los hongos. Asociación Intermunicipal para el Desarrollo Rural de la Comarca. Asider, España.
- López J. 2008. Los alimentos funcionales: Importancia y Aplicaciones. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Chile. <https://www.zamorano.edu/2018/06/08/alimentos-funcionales-que-son-y-cuales-estan-disponibles/>
- Mariaca R, Silva LC, Castaños CA. 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. *Cienc Ergo Sum*. 8: 30-40.
- Martínez-Soto, Paredes-López O y Bautista-Justo M. 2001. Biotecnología para la producción y conservación de hongos comestibles. Cultivo de *Pleurotus ostreatus*, Editorial FROMES, SEP. Guanajuato, Gto. 55.
- Mata M, Halling R y Muller GM. 2003. Macrohongos de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio. Santo Domingo de Heredia Costa Rica.
- Méndez EV y Monge NJ. 2007. Costa Rica Historia Natural. EUNED. San José, Costa Rica.
- Merino-Alcántara M. 2017. *Amanita rubescens*. <http://www.micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/DMerinoA/Aportaciones031/Amanita%20rubescens.pdf>
- Miranda C. 2003. Antioxidant Activities of flavonoids. Department of Environmental and Molecular Toxicology Oregon State University

- Montoya A, Hernández N, Mapes C, Kong A y Estrada-Torres A. 2008. The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, México. *Econ Bot.* 62(3): 413-424.
- Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Cifuentes J, Caballero J. 2004. Use of wild fungi of La Malinche National Park, México. *Econ Bot.* 63(3): 413-424.
- Moreno G, Esteve-Raventós F, Blanco, Llana C y Rejos JM. 2010. Hongos del campus y sus alrededores. Cuadernos del campus: Naturaleza y Medio Ambiente No 7. Eco Campus Universidad de Alcalá. Madrid, España.
- Moreno-Fuentes A, y Bautista-Nava E. 2006. El hongo patón *Pleurotus albidus*, en Hidalgo su primer registro en México. *Rev Mex de Micol.* 22:41-47.
- Morigiwa A, Kitabatake K y Fujimoto Y. 1986. Angiotensin converting enzyme inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull.* 34:3025–3028.
- Naczka M, Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.* 1054, 95.
- Niedermeyer TH, Lindequist U y Mentel R. 2005. Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *J Nat Prod* 68(12):1728–173.
- Padilla A, Savedra S, Petit J, Iglesias A. 2005. Habitantes de los bosques y desarrollo sostenido. *Rev For Latin.* 37:45-58.
- Pérez C. 2000. Estudio de validación de la Metodología para la determinación de Vitamina A en Alimentos infantiles instantáneos por Cromatografía Líquida de alto rendimiento (HPLC). *Rev. perú. med. exp. Salud pública.* 17(1-4): 26-29.
- Pérez N, Lugo C, Gutiérrez L y Del Toro S. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cascara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, Vol. XV, N°. 3 18-22.
- Petti S y Scully C. 2009. Polyphenols, oral health and disease: A review, *Journal of Dentistry.* 37: 413–423
- Primo, E. 2007. Flavonoides y antocianos. In *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (pp. 915–918). Barcelona: Reverté.

- Ramírez-Anguiano AC. 2009. Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Rathee S, Rathee D, Rathee D, Kumar V y Rathee P. 2012. Mushroom as therapeutic agents. *Braz J Pharmacog.* 22(2): 459-474.
- Reyes- García M, Gómez-Peralta M y Zamora-Esquihua V. 2009. Guía de hongos de los alrededores de Morelia. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Museo de Historia Natural, Morelia, Michoacán.
- Reyes V. 2009. Conocimiento ecológico tradicional para la conservación. *Papeles de relaciones ecosociales y cambio global.* 107: 39-55.
- Ricco RA, Agudelo IJ, y Wagner ML. (2015). Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa* 52.
- Rice-Evans CA, Miller NJ y Paganga J. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, 20:933-956.
- Rivero-Rosales A y Betancort-Rodríguez JR. 2006. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas.
- Rosales L. 2008. Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automóvil con el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* en Durango. Tesis de maestría en Gestión Ambiental: CIIDIR-IPN
- Royse DJ y May. 2003. Multilocus enzyme electrophoresis for the genetic analysis of edibles mushroom. In *Genetics and breeding of edible mushrooms* (Eds. Chang, S. T., Buswell J. A. y Miles, P. G.). Gordon and Breach Science Publishers. The Netherlands. 224-248.
- Ruan-Soto F. 2005. Etnomicología en la Selva Lacandona: percepción, uso y manejo de hongos en Lacanjá-Chansayab y Playón de la Gloria, Chiapias. Tesis de Maestría. Colegio de la Frontera Sur, México.
- Ruiz-Herrera J. 2012. *Fungal cell Wall: structure, synthesis, and assembly*, 2nd edn. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.

- Sánchez RJ. 2015. Guía micológica y de Micoturismo de Aliste, Tabara y Alba. Asociación para el desarrollo de Aliste, Tabara y Alba (ADATA). Instituto de Restauración y Medio Ambiente (IRMA). España.
- Saskia ABE, Accker V y Bast AALT. 1998. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: Flavonoids in health and Disease. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 9:221-251
- Shahidi F y Naczk M. 1995. Food phenolics sources, chemistry, effects, applications. Tochnomic Publishing Co. EE.UU.106.
- Shahidi F y Naczk M. 2004. Pheloics in food and nutaceuticals. CRC Press. Londres. 1-16.
- Shu-Yao T, Hui-Li T y Jeng.Leun M. 2007. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. Swiss Society of Food Science and Technology. 40: 1392-1402.
- Sobrado SV, Cabral LE y Romero F. 2013. Hongos: diversidad vegetal. Facultad de Ciencias Exactas y Agricultura. Universidad Nacional del Noreste.
- Song HH, Chae HS, Oh AR, Lee HK, Chin YW. 2012. Anti-inflammatory and anti-allergi effect of *Agaricus blazei* extract in bone marrow-derived mast cells. Am J Chin Med. 40(5): 1073-1084.
- Tabarez-Sánchez A. 2017. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos y xantonas en un modelo químico y celular. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. Tepetitla, Tlaxcala.
- Toledo V. 2009. Por qué los pueblos indígenas son la memoria de las especies. Papeles de relaciones escolares y cambio global. 107: 31-32.
- Toledo VM y Barrera-Bassols N. 2008. La memoria biocultural, la importancia ecológica de las sabidurías tradicionales. Icaria editorial. Barcelona, España.
- Viller RL, Rojas GF y Tenorio LP. 2006. Guía botánica del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala-Puebla, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vincent HK y Taylor AG. 2006. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. International Journal of Obesity. 30:400-4128.

Xu T y Beelman RB. 2015. The bioactive compounds in medical mushroom have potential protective effects against neurodegenerative diseases. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.* 1(2): 62-65.

Yang JH, Lin HC, Li RC y Mau JL. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry.* 77. 229-235.

Zamora M, Alvarado G y Dominguez JM. 2000. *Hongos silvestres comestibles de Tlaxclala, Parte 1.* México: INIFAP.