



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONTENIDO  
NUTRIMENTAL EN DIFERENTES MEDIOS DE  
CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CONTENIDO  
DE POLIFENOLES EN *Pleurotus djamor* (Rumph. ex  
Fr.) Boejin PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ERÉNDIRA ALVARADO CORDERO

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. LUIS ANTONIO HERNÁNDEZ  
GONZÁLEZ



Los Reyes, Iztacala, Estado de México. 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## *Dedicatoria*

*Mi vida no será suficiente para agradecerles su apoyo, consejos, sacrificios, privaciones y desvelos que vivieron conmigo para concluir con éxito el presente trabajo. También porque en sus corazones siempre he encontrado amor, aliento, alegría y confianza.*

*“Mis hijos”*

*Daniela y Johan Muedano Alvarado*

*y*

*“Mis padres”*

*Silviana Cordero de la Cruz y Apolonio Jorge Alvarado Rojas*

*Agradezco a Dios porque son mis ángeles de la guarda que me acompañan día a día, y me han enseñado a ser valiente y luchar por mis sueños. También por la hermosa vida que me ha dado.....GRACIAS.*



## Agradecimientos

“A mi asesor”

Por su apoyo, atención, y sobre todo por su amistad.....gracias.

M. en C. Luis Antonio Hernández González

“A mis profesores”

Por todas sus enseñanzas, consejos y tiempo ocupado para la realización del presente trabajo. Por su atención gracias.

- ❖ Dra. Ana María García Bores
- ❖ Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
- ❖ Biol. Deni
- ❖ Biol. Soledad Chino Vargas
- ❖ Biol. Víctor Manuel Esparza Martínez
- ❖ Biol. Felix Castro

“A mi familia”

Porque sin su apoyo nunca lo hubiera logrado, gracias por sus palabras de aliento, consejos, y sobre todo por enseñarme a seguir luchando por mis sueños. Que Dios los bendiga.

- ❖ Fam. Alvarado Lozano
- ❖ Fam. Alvarado Hernández
- ❖ Fam. Alvarado Rojas
- ❖ Fam. Vargas García

*“A mis amigos”*

*Mil gracias por su amor, paciencia, consejos, lealtad y apoyo. También por todos los momentos increíbles llenos de diversión que hemos vivido juntas y porque nunca me han dejado sentir sola ya que siempre han luchado a mi lado..... Mariela, Denisse, Leslie, María y Karen las quiero como unas verdaderas hermanas.*

*Por todas las risas, compañía y apoyo que me han mostrado desde que los conocí..... Ernesto, Daniela, Brenda, Juan Francisco, Jozelyn, Montserrat, Edgar, Eduardo, Tania y Emmanuel.*

*Por todo lo que me enseñaron, sus consejos, su apoyo, así como su compañía en el laboratorio y estar siempre al pendiente de mí..... Gracias Didier Sánchez Saldaña e Iván Humberto Bernardino González fueron de suma importancia para que se llevara a cabo el presente trabajo.*

## ÍNDICE

### Contenido

i.	Índice de figuras.....	8
ii.	Índice de tablas.....	11
iii.	Abreviaturas.....	12
1.	RESUMEN.....	13
2.	INTRODUCCIÓN.....	14
3.	GENERALIDADES.....	17
3.1.	Características distintivas de los hongos.....	17
3.1.1.	Hábitats y función en la naturaleza.....	17
3.1.2.	La reproducción de los hongos.....	18
3.2.	Los basidiomicetos.....	19
3.2.1.	Los basidiocarpos de los hongos seta.....	21
3.3.	Cómo crecen los hongos.....	21
3.3.1.	Fases de crecimiento <i>in vitro</i> .....	22
3.3.1.1.	Fase de latencia.....	22
3.3.1.2.	Fase exponencial.....	22
3.3.1.3.	Fructificación.....	23
3.3.1.4.	Fase de declinación <i>in vitro</i> .....	23
3.3.1.5.	Fase estacionaria y muerte.....	23
3.4.	México el mayor productor de hongos comestibles en Latinoamérica.....	24
3.4.1.	Producción nacional.....	24
3.4.2.	Biotecnología.....	24
3.5.	Hongos del género <i>Pleurotus</i> “podredumbre blanca”.....	25
3.6.	Clasificación taxonómica de <i>Pleurotus djamor</i> .....	26
3.7.	Factores que afectan el crecimiento de <i>Pleurotus spp</i> .....	27
3.7.1.	Temperatura.....	27
3.7.2.	Humedad.....	27
3.7.3.	pH.....	28
3.7.4.	Luz.....	28
3.7.5.	Aireación.....	28
3.7.6.	Requerimientos nutricionales.....	29
3.7.6.1.	Nitrógeno.....	29
3.7.6.2.	Compuestos de carbono.....	29

3.7.7.	Relación C/N.....	30
3.8.	Valor nutricional.....	30
3.9.	Valor medicinal.....	33
3.10.	Metabolitos secundarios.....	33
3.10.1.	Funciones de los metabolitos secundarios.....	34
3.10.2.	Composición química de los metabolitos secundarios.....	35
3.11.	Polifenoles.....	36
3.11.1.	Origen, estructura y distribución de los polifenoles.....	36
3.12.	Radicales libres.....	38
3.12.1.	Biomecanismos de formación de radicales libres.....	40
3.12.2.	Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN).....	40
3.12.3.	Fuentes fisiológicas de los radicales libres.....	41
3.13.	Sistemas de defensa antioxidantes.....	43
3.14.	Antioxidantes.....	44
3.15.	Estrés oxidativo.....	45
3.15.1.	Estrés oxidativo y las enfermedades crónico degenerativas.....	45
4.	ANTECEDENTES.....	47
5.	JUSTIFICACIÓN.....	49
6.	HIPÓTESIS.....	49
7.	OBJETIVO GENERAL.....	50
8.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
8.1.	Material biológico.....	51
8.2.	Medios de cultivo sólido.....	51
8.3.	Determinación de curva de crecimiento micelial en medio de cultivo sólido.....	52
8.4.	Determinación de biomasa de <i>P. djamor</i> en medio de cultivo líquido.....	52
8.5.	Producción de carpóforos.....	52
8.5.1.	Inóculo de granos de trigo a partir de micelio de <i>P. djamor</i> crecido en medio sólido.....	52
8.5.2.	Preparación del sustrato.....	53
8.5.3.	Obtención de cuerpos fructífero de <i>P. djamor</i> .....	54
8.5.4.	Parámetros de productividad.....	54
8.6.	Obtención de extracto etanólico de micelio y cuerpo fructífero de <i>P. djamor</i> .....	56
8.7.	Determinación del contenido de fenoles totales en <i>P. djamor</i> .....	56
8.8.	Determinación de la actividad antioxidante de <i>P. djamor</i> por el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).....	57

8.9.	Cálculo de CE <sub>50</sub> .....	58
8.10.	Análisis estadístico.....	58
9.	RESULTADOS.....	59
9.1.	Material biológico.....	59
9.2.	Curva de crecimiento micelial de <i>P. djamor</i> en medio de cultivo sólido.....	59
9.3.	Producción de biomasa de <i>P. djamor</i> en medio de cultivo líquido.....	63
9.4.	Obtención de inóculo-grano “semilla”.....	66
9.5.	Fructificación y cosecha.....	67
9.6.	Parámetros de productividad.....	67
9.6.1.	Precocidad (Pr).....	67
9.6.2.	Clasificación de los carpóforos.....	68
9.6.3.	Peso de los cuerpos fructíferos cosechados (PMCF).....	70
9.6.4.	Eficiencia Biológica (%EB).....	70
9.6.5.	Tasa de producción (TP).....	71
9.7.	Contenido fenólico total.....	73
9.7.1	Rendimiento de extracto etanólico de micelio de <i>P. djamor</i> .....	73
9.7.2.	Contenido de fenoles totales en micelio de <i>P. djamor</i> .....	75
9.7.3.	Rendimiento del extracto etanólico de basidiocarpo de <i>P. djamor</i> .....	77
9.7.4.	Contenido de fenoles totales en basidiocarpo seco de <i>P. djamor</i> .....	78
9.7.5.	Comparación de contenido fenólico total en micelio y basidiocarpo de <i>P. djamor</i> .....	80
9.8.	Determinación de la actividad antioxidante de <i>P. djamor</i> .....	82
9.8.1.	Actividad antioxidante en micelio de <i>P. djamor</i> .....	82
9.8.2.	Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones del extracto etanólico del micelio seco de <i>P. djamor</i> .....	84
9.8.3.	Actividad antioxidante en basidiocarpo de <i>P. djamor</i> .....	84
9.8.4.	Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones del extracto etanólico (ppm) del basidiocarpo de <i>P. djamor</i> .....	86
9.8.5.	Comparación de la actividad antioxidante entre micelio y basidiocarpo de <i>P. djamor</i> con la CE <sub>50</sub> .....	87
10.	CONCLUSIONES.....	90
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida de basidiomicetos.....	20
Figura 2.	<i>Pleurotus djamor</i> .....	26
Figura 3.	Estructural principales de un fenol.....	36
Figura 4.	Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles. CoA=Coenzima A..	37
Figura 5.	Medición de crecimiento micelial de <i>P. djamor</i> en medio de cultivo sólido con diferente composición nutrimental.....	52
Figura 6.	Producción de biomasa de <i>P. djamor</i> en diferentes medios de cultivo líquido.....	53
Figura 7.	Producción de inóculo- semilla de <i>P. djamor</i> en trigo.....	53
Figura 8.	Pasteurización de paja de trigo.....	54
Figura 9.	Empaquetamiento de paja de trigo.....	54
Figura 10.	Incubación de la semilla de <i>P. djamor</i> en las bolsas con paja de trigo..	55
Figura 11.	Cosecha de cuerpos fructíferos de <i>P. djamor</i> .....	55
Figura 12.	Elaboración de extractos etanólicos en <i>P. djamor</i> de 24 y 48 h.....	56
Figura 13.	Evaluación de fenoles totales por la técnica de Folin-Ciocolteau.....	57
Figura 14.	Decoloración del DPPH por el extracto etanólico de <i>P. djamor</i> a diferentes concentraciones.....	58
Figura 15.	Desarrollo del micelio de la cepa de <i>P. djamor</i> , en tres medios de cultivo sólidos con diferente composición nutrimental.....	59
Figura 16.	Primera comparación del crecimiento micelial de <i>P. djamor</i> en medio de cultivo sólido.....	60
Figura 17.	Segunda comparación del crecimiento micelial de <i>P. djamor</i> en medio de cultivo sólido.....	60
Figura 18.	Velocidad de crecimiento de <i>P. djamor</i> , en diferentes medios de cultivo sólidos, con una composición nutrimental para cada medio.....	61
Figura 19.	Velocidad de crecimiento de <i>P. djamor</i> , en diferentes medios de cultivo sólidos, con una composición nutrimental para cada medio.....	61
Figura 20.	Peso húmedo de la biomasa de micelio de <i>P. djamor</i> .....	64

Figura 21.	Comparación de la producción de biomasa micelial de <i>P. djamor</i> en medio líquido con diferente composición nutrimental.....	65
Figura 22.	Biomasa en peso seco del micelio de <i>P. djamor</i> .....	65
Figura 23.	Invasión de grano de trigo con micelio de <i>P. djamor</i> cultivado en medio A.....	66
Figura 24.	Invasión de grano de trigo con micelio de <i>P. djamor</i> cultivado en medio B.....	66
Figura 25.	Invasión de grano de trigo con micelio de <i>P. djamor</i> cultivado en medio M.....	66
Figura 26.	Precocidad (Pr) de la cepa de <i>P. djamor</i> .....	68
Figura 27.	Basidiocarpos de la cepa <i>P. djamor</i> , obtenidos de micelio crecido con diferente composición nutrimental.....	69
Figura 28.	Mediciones promedio de los píleos de cuerpos fructíferos de <i>P. djamor</i> .....	69
Figura 29.	Peso promedio de cuerpos fructíferos cosechados de la cepa <i>P. djamor</i> .....	70
Figura 30.	Eficiencia biológica (%EB) presentada por la cepa de <i>P. djamor</i> proveniente de micelio crecido en diferentes medio de cultivo sólido con diferente composición nutrimental.....	71
Figura 31.	Tasa de producción presentada por la cepa de <i>P. djamor</i> .....	72
Figura 32.	Rendimiento del extracto etanólico de micelio seco de <i>P. djamor</i> .....	74
Figura 33.	Concentración de fenoles totales en el extracto etanólico de <i>P. djamor</i> .....	76
Figura 34.	Concentración de fenoles totales en el micelio seco de <i>P. djamor</i> .....	76
Figura 35.	Rendimiento del extracto etanólico seco de basidiocarpo de <i>P. djamor</i> .....	78
Figura 36.	Concentración de fenoles totales en el extracto etanólico de basidiocarpo de <i>P. djamor</i> .....	79
Figura 37.	Concentración de fenoles totales de basidiocarpo seco de <i>P. djamor</i> ..	80
Figura 38.	Comparación del contenido fenólico total en el tejido vegetativo y diferenciado en peso seco de <i>P. djamor</i> .....	81
Figura 39.	Actividad antioxidante del extracto etanólico (24 h) de micelio de <i>P. djamor</i> en medio B y M, con su respectiva ecuación.....	83

Figura 40.	Actividad antioxidante del extracto etanólico (48 h) de micelio de <i>P. djamor</i> en medio B y M, con su respectiva ecuación.....	83
Figura 41.	Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones de extracto etanólico (24 h), de micelio de <i>P. djamor</i> en los diferentes medios de cultivo.....	84
Figura 42.	Actividad antioxidante del extracto etanólico (24 h) de basidiocarpo seco de <i>P. djamor</i> en medio A, B y M con su respectiva ecuación de la recta.....	85
Figura 43.	Actividad antioxidante del extracto etanólico (48 h) de basidiocarpo de <i>P. djamor</i> en medio A, B y M con su respectiva ecuación de la recta.....	86
Figura 44.	Comparación de la actividad antioxidante de por concentraciones de extracto etanólico (24 h), de basidiocarpo de <i>P. djamor</i> en los diferentes medios de cultivo.....	87
Figura 45.	Comparación de actividad antioxidante entre micelio y basidiocarpo de <i>P. djamor</i> .....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición del hongo de <i>Pleurotus spp.</i> .....	31
Tabla 2.	Contenido de vitaminas de <i>Pleurotus spp.</i> .....	31
Tabla 3.	Perfil de aminoácidos esenciales de <i>Pleurotus sp.</i> .....	32
Tabla 4.	Contenido de minerales en <i>Pleurotus sp.</i> en peso seco (mg/kg)..	32
Tabla 5.	Composición nutrimental para los medios de cultivo sólidos (g/100mL).....	51
Tabla 6.	Clasificación del tamaño de píleo alcanzado por los carpóforos..	55
Tabla 7.	Área de cobertura total de micelio de <i>P. djamor</i> cultivados en medio sólido.....	62
Tabla 8.	Velocidad de crecimiento del micelio de <i>P. djamor</i> en medio de cultivo sólido con diferente composición nutrimental.....	62
Tabla 9.	Biomasa en peso fresco y seco (g), con 28 días de incubación, en medio líquido.....	64
Tabla 10.	Promedio de porcentaje de la eficiencia biológica (%EB) y tasa de producción (TP) de <i>P. djamor</i> .....	71
Tabla 11.	Rendimiento de extracto etanólico de micelio seco en <i>P. djamor</i> .....	74
Tabla 12.	Fenoles totales en micelio seco de <i>P. djamor</i> .....	75
Tabla 13.	Rendimiento de extracto etanólico de basidiocarpo seco de <i>P. djamor</i> .....	77
Tabla 14.	Fenoles totales en basidiocarpo seco de <i>P. djamor</i> .....	79
Tabla 15.	Comparación del contenido fenólico total en micelio y basidiocarpo seco de <i>P. djamor</i> .....	81
Tabla 16.	Comparación de la actividad antioxidantes del extracto etanólico (24 h) del basidiocarpo de <i>P. djamor</i> , entre los medios de cultivo con diferente composición nutrimental.....	87
Tabla 17.	Comparación de la CE <sub>50</sub> del extracto etanólico de micelio y basidiocarpo seco de <i>P. djamor</i> .....	88

## ABREVIATURAS

A	Absorbancia del blanco
A <sub>1</sub>	Absorbancia de la muestra
ABTS	Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Agar de papa dextrosa
AEM	Extracto de malta
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
CE <sub>50</sub>	Concentración necesaria para decoloración del DPPH al 50%
DE	Desviación estándar
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
ELP	Extracto de pulpa de café suplementado con glucosa
EMA	Extracto de malta
EMP	Vía Emden-Meyerhof-Parnas
EOx	Estrés oxidativo
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EST	Extracto de salvado de trigo
GAE	Equivalentes a ácido gálico
GHS	Glutación
GHX	Glutación peroxidasa
PF	Pentosa fosfato
ppm	Partes por millón
PMCF	Promedio de los cuerpos fructíferos cosechados
Pr	Precocidad
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
SOD	Superóxido dismutasa
TP	Tasa de producción
$\bar{X}$	Media
%EB	Eficiencia biológica
nm	Nanómetros

## 1. RESUMEN

A los hongos del género *Pleurotus* se les considera un producto alimenticio con alto valor nutricional. También se han encontrado en ellos compuestos bioactivos como los polifenoles, a quienes se les atribuye la actividad antioxidante del hongo. Sin embargo, depende en gran medida la composición del sustrato donde sea cultivado para que pueda producir biomasa en la etapa vegetativa, basidiocarpos, así como la cantidad de metabolitos secundarios. Por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó la influencia de tres medios de cultivo con diferente composición nutrimental (medio A, B y M) en la producción y en el contenido de polifenoles de *Pleurotus djamor* así como su efecto en la actividad antioxidante.

El crecimiento vegetativo de la cepa se evaluó con dos ensayos de 8 y 11 días de incubación. El mayor crecimiento micelial fue en el medio sólido B con  $38.02 \pm 5.96$  y  $51.87 \pm 2.70$  cm<sup>2</sup> y una velocidad de crecimiento de  $4.33 \pm 0.32$  y  $3.69 \pm 0.09$  mm/día respectivamente. En la obtención de biomasa total seca, durante 28 días de incubación el micelio crecido en medio de cultivo líquido M produjo mayor cantidad con  $0.80 \pm 0.08$  g.

En base a los resultados de los parámetros de productividad, en el presente trabajo se clasifica la cepa de *P. djamor* dentro de la categoría G1 ya que el promedio de las mediciones del píleo están en el rango <5 cm, también se considera recomendable para producir ya que obtuvo un porcentaje de eficiencia biológica alto con  $268.75 \pm 18.22$  para los cuerpos fructíferos provenientes de micelio crecido en medio de cultivo M y una tasa de producción de  $5.70 \pm 0.60$ , así como una precocidad de 27.8 días.

El contenido de fenoles totales se evaluó en extracto etanólico del hongo, determinándolo como equivalentes del ácido gálico GAE mg/g de micelio seco, dando como resultado que el extracto proveniente de micelio crecido en medio de cultivo M presentó el valor más alto de  $7.91 \pm 0.65$ , lo cual puede reflejar que el micelio crecido en medio de extracto de malta, favorece la producción de fenoles en el micelio. El extracto etanólico de cuerpo fructífero seco y crecido en medio de cultivo B con  $7.04 \pm 1.12$ , seguido del medio M con  $6.06 \pm 1.06$ , estadísticamente no tuvieron diferencias significativas. El micelio de *P. djamor* mostró poca actividad antioxidante, con la concentración necesaria para la decoloración del 50% de DPPH (CE<sub>50</sub>; calculada) de  $2328.86 \pm 581.44$  ppm del extracto de micelio crecido en medio M. Por otra parte, la CE<sub>50</sub> del extracto etanólico del basidiocarpo fue de  $769.92 \pm 201.28$  ppm en medio M, lo cual indica que mientras más alto es el contenido fenólico en el basidiocarpo fue mejor la actividad de captación de radicales libres.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los basidiomicetos son los organismos más complejos del reino Fungi y son considerados como el segundo grupo más grande de organismos en la biosfera, después de los artrópodos (Brizuela *et al.*, 1998). Los basidiomicetos se consideran la mayor fuente de productos naturales biológicamente activos, ya sean compuestos, constitutivos del macromiceto o metabolitos secundarios producidos por los mismos (González *et al.*, 2009).

Por otra parte, el cultivo de hongos comestibles es una actividad que se ha implementado desde hace más de 200 años en Europa con la producción de champiñón (*Agaricus bisporus*) y Asia con el cultivo de especies como shiitake (*Lentinula edodes*) y oreja de Judas (*Auricularia spp.*). El cultivo de hongos del género *Pleurotus*, a pesar de ser relativamente reciente ha tenido un incremento significativo, de tal manera que en la actualidad se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Su caso merece una atención especial, a diferencia de otros géneros cultivados hasta ahora, debido a la diversidad de sustratos sobre los que es capaz de crecer, permitiendo apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos para el aprovechamiento de desechos agropecuarios (Royse y Sánchez, 2001).

En la actualidad la producción de hongos comestibles cultivados se lleva a cabo en más de 80 países. Las diferentes especies de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. colomboinus*, *P. cornucopiae*) se encuentran en la segunda posición entre los hongos comestibles cultivados con el 24% de la producción mundial (Royse y Sánchez, 2001).

En México, los hongos del género *Pleurotus* (*P. ostreatus* y afines) se conocen comúnmente como «setas». Nuestro país también es pionero en el cultivo de setas en América Latina ya que dicha actividad inició en los años 70, desde entonces el interés por su propagación y consumo ha ido en aumento. Debido a la relativa facilidad del cultivo de las setas, en la última década sus niveles de producción aumentaron alrededor de 400 %. México produce cerca de 4 mil toneladas de setas anualmente, logrando la mayor producción total de América Latina (Gaitán *et al.*, 2002).

Las setas tienen un alto interés en agronomía, para la alimentación humana y animal, pero también para el descubrimiento y producción de moléculas o compuestos con valor agregado en la industria química y farmacéutica. Así mismo, con rendimiento potencial y alto valor nutritivo. Los hongos comestibles *Pleurotus spp.*, se han reconocido por sus proteínas, las cuales contienen aminoácidos, con una calidad muy cercana a la proteína animal, también contienen carbohidratos, en particular carbohidratos poliméricos como la

quitina, y varios de bajo peso molecular como la glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, entre otros (Royse y Sánchez, 2001).

En la actualidad nuevas tecnologías y técnicas de producción están en constante desarrollo, así como el número de parámetros controlables del medio ambiente. La fermentación en estado sólido constituye una herramienta biotecnológica compatible con el medio físico, económico y social, si se aplica apropiadamente. Permitiendo un aumento en el rendimiento económico por unidad de área, sin aumentar la presión sobre los recursos naturales disponibles y los costos de conservación a largo plazo, toda vez que se recicla el subproducto biodegradado por la acción del hongo (Toledo 2008). Actualmente la fermentación en estado sólido, en la producción del cuerpo fructífero de *Pleurotus spp.* es usada en la transformación de desechos en alimento animal. Por otro lado, el cultivo sumergido en fermentación líquida puede proporcionar biomasa más uniforme y reproducible. La investigación actual en *Pleurotus spp.* relacionada con el cultivo en estado sólido y líquido se ocupa principalmente para la optimización de los parámetros de cultivo y la variedad de composición de sustratos (Gregori *et al.*, 2007).

Los hongos comestibles del género *Pleurotus spp.* presentan una capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos apenas investigada. Estos compuestos son agrupados generalmente acorde a su naturaleza química, teniendo en cuenta la relación entre ésta y las diferentes actividades biológicas descritas (Brizuela *et al.*, 1998). Entre los principales compuestos activos aislados de *Pleurotus spp.* se encuentran los proteoglicanos y polisacáridos, para los cuales se ha demostrado actividad antitumoral, inmunomoduladora, hipoglucemiante, antimicrobiana, antioxidante, antifúngica y antiviral (González *et al.*, 2009). Esta amplia gama de metabolitos secundarios es debida principalmente a que los hongos son incapaces de sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz por el hecho de no poseer clorofila, por lo tanto, su biogénesis está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes que conforman el sustrato donde se desarrollan, además de las condiciones climáticas que los rodean, haciendo que los hongos presentes en regiones geográficas diferentes o que crezcan en sustratos que varíen en composición, puedan alterar y cambiar su metabolismo generando una amplia variedad de compuestos químicos (Guzmán *et al.*, 2009).

Otro tipo de compuestos presentes en los hongos son los fenólicos o polifenoles, los que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica. Químicamente, los compuestos fenólicos son

sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos. Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Martinez *et al.*, 2002; Scalbert *et al.*, 2005).

El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo (Miller *et al.*, 1993).

Se ha sugerido que los radicales libres pueden generar cambios oxidativos sobre las biomoléculas, desencadenando patologías entre las que se cuentan: aterosclerosis, cáncer, diabetes, inflamación y enfermedades degenerativas (Jiménez *et al.*, 2005). Actualmente existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres. Entre ellos se puede mencionar el uso del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazina (DPPH) que se basa en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo para reaccionar con donadores de electrones y ser cuantificado espectrofotométricamente (Molyneux 2004; Ramos *et al.*, 2008).

### **3. GENERALIDADES**

#### **3.1. Características distintivas de los hongos**

Los hongos constituyen un grupo muy variable y polimórfico difícil de caracterizar, sin embargo, cuando se hace referencia a ellos se habla de organismos que nacen de esporas, carecen de clorofila, se reproducen sexualmente o asexualmente y tienen un cuerpo generalmente formado por filamentos muy ramificados llamados hifas, los cuales en conjunto forman el micelio. El crecimiento del micelio sólo se da en las puntas, por lo que forman masas algodonosas o afelpadas de forma radial, que es común observar en la hojarasca, troncos caídos, en el suelo de bosques y praderas húmedas. Se distinguen de las plantas porque no almacenan su energía en forma de almidón, polisacárido insoluble que forma las reservas alimenticias de las plantas. En su lugar, almacenan otros polisacáridos como la trehalosa y el glucógeno, polímero de la glucosa que los animales utilizan para almacenar energía por corto tiempo (Huerta 2002).

La estructura de su cuerpo está formado por conjuntos de hifas o micelio. En las hifas de los hongos inferiores el citoplasma es generalmente continuo, no está separado por septos, posee numerosos núcleos minúsculos, que se desplazan libremente por una corriente citoplasmática que también permite el transporte de elementos nutritivos al interior del micelio. Por el contrario, los hongos superiores tienen septos con perforaciones centrales que permiten el paso del citoplasma (Huerta 2002).

##### **3.1.1. Hábitats y función en la naturaleza**

Los hongos se encuentran en todos lados; pueden vivir en el suelo, en aguas dulces y marinas y sus esporas son abundantes en el aire. Sin importar donde estén, podemos decir que hay muy pocos substratos libres de hongos. Para alimentarse secretan enzimas sobre el substrato donde se encuentran, lo degradan en sustancias simples y absorben los nutrimentos necesarios para su desarrollo. Los que producen este tipo de cambios se conocen como saprófitos, debido a que se alimentan de cuerpos muertos o de desechos de organismos. Los parásitos pueden penetrar las células de tejidos vegetales y animales y tomar sus nutrimentos del interior de éstas. Algunos de los saprófitos pueden vivir como parásitos si se les presenta la oportunidad, mientras que otros son siempre parásitos y no pueden vivir de otra manera. Ya sean saprófitos o parásitos, todos los hongos son heterótrofos, pues ninguno de ellos es capaz de sintetizar compuestos de carbono complejos a partir de dióxido de carbono como las plantas. Algunos realizan asociaciones

de tipo simbiótico con las raíces de las plantas, conocidas como micorrizas, o con algas para dar origen a nuevos organismos llamados líquenes. Los hongos juegan un papel muy importante en la naturaleza, y junto con las bacterias forman el grupo de los descomponedores dentro de los ciclos tróficos del carbono, nitrógeno y azufre (Huerta 2002).

### **3.1.2. La reproducción de los hongos**

La reproducción es la formación de nuevos individuos con características típicas de la especie. En el caso de los hongos podemos observar que hay dos tipos para dar origen a nuevos individuos: la sexual y la asexual. A esta última también se le conoce como somática o vegetativa, debido a que no involucra fusión de núcleos. Se puede dar por fragmentación del micelio, el cual al colocarse bajo condiciones adecuadas de temperatura, humedad y substrato, da origen a nuevo individuo. Este tipo de crecimiento es muy utilizado para multiplicar los hongos comestibles en el laboratorio, debido a que permite mantener las características de la cepa que se está cultivando (Huerta 2002).

En otros casos el micelio da origen a esporas asexuales por división mitótica; las cuales se denominan según el nombre de la estructura que las produce. Este tipo de reproducción es poco frecuente en hongos comestible (Huerta 2002).

La reproducción sexual no es rápida e implica somatogamia (unión de hifas o gametos), cariogamia (fusión de núcleos) y la producción de gametos por meiosis. En los hongos las hifas que forman el micelio actúan como gametos y su sexualidad está determinada por genes nucleares, que confieren un carácter genético conocido como compatibilidad sexual. Esto hace que sólo aquellas hifas provenientes de micelios compatibles se fusionen y den origen por somatogamia a un compartimento hifal con dos tipos de núcleos diferentes. A partir de este compartimento se produce la dicarionización del micelio para dar origen a lo que es llamado micelio heterocariótico (con diferentes tipos de núcleos). La cariogamia generalmente se presenta tiempo después de la somatogamia, por lo que el micelio heterocariótico se puede multiplicar y mantener sin dificultad. La fusión de núcleos sólo se dará en la basidia, la cual originará por meiosis las esporas de origen sexual (basidiosporas). La reproducción sexual en hongos permite la variación genética y capacita a las especies para ocupar nuevos nichos o sobrevivir a condiciones adversas y les permite tener una vida más larga que aquellos que solo se reproducen asexualmente (Huerta 2002).

Las esporas de tipo sexual al igual que las de origen asexual se denominan según el tipo de estructura que las porta, un ejemplo de las formadas por la fusión de gametos compatibles pero indiferenciados: basidiosporas, las cuales se forman sobre estructuras similares a un mazo (Huerta 2002).

Para que el cuerpo fructífero (seta) se desarrolle, es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto de contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo y con dos tipos de núcleos y su posterior migración, hacia los compartimentos de compatibilidad sexual contraria al núcleo que migra se forma el micelio heterocarión o dicarión, según sea el caso. A este tipo de micelio también se le conoce como micelio secundario (figura 1; Huerta 2002).

### **3.2. Los basidiomicetos**

Los basidiomicetos forman un grupo de hongos muy grande y diverso que se caracteriza porque produce esporas sexuales en cuerpos fructíferos llamados basidiocarpos, también conocidos como basidiomatas o basidiomas (del griego *basidion* = base pequeña, basidio + *karpos* = fruto), el cual porta estructuras especializadas conocidas como basidias. En la mayoría de las especies, cada basidia produce cuatro basidiosporas, que son fuertemente disparadas al llegar a su madurez (balistosporas). La mayoría de estos hongos produce un micelio bien desarrollado, con septos simples o doliporo, dependiendo del orden taxonómico. A menudo se dispersa hacia el frente, creciendo en forma de abanico, puede entretorse formando estructuras parecidas a cuerdas o raíces, resistentes a condiciones adversas como la falta de nutrientes o la humedad. En condiciones adversas pueden permanecer latentes hasta que las condiciones favorables para el crecimiento se presenten nuevamente. Comúnmente son producidos por muchas especies de hongos ectomicorrízicos y por varios descomponedores de la madera y son importantes para la acumulación de nutrientes. El micelio también puede organizarse y formar tejidos durante la fase sexual de su ciclo reproductivo y dar origen a cuerpos fructíferos de formas muy diversas, desde delgados, costrosos o gruesos, pueden presentar forma de seta, coral, estrella o nido de pájaro. Pueden estar brillantemente coloreados o no, tener consistencia carnosa, esponjosa, cartilaginosa o cualquier textura (Huerta 2002).

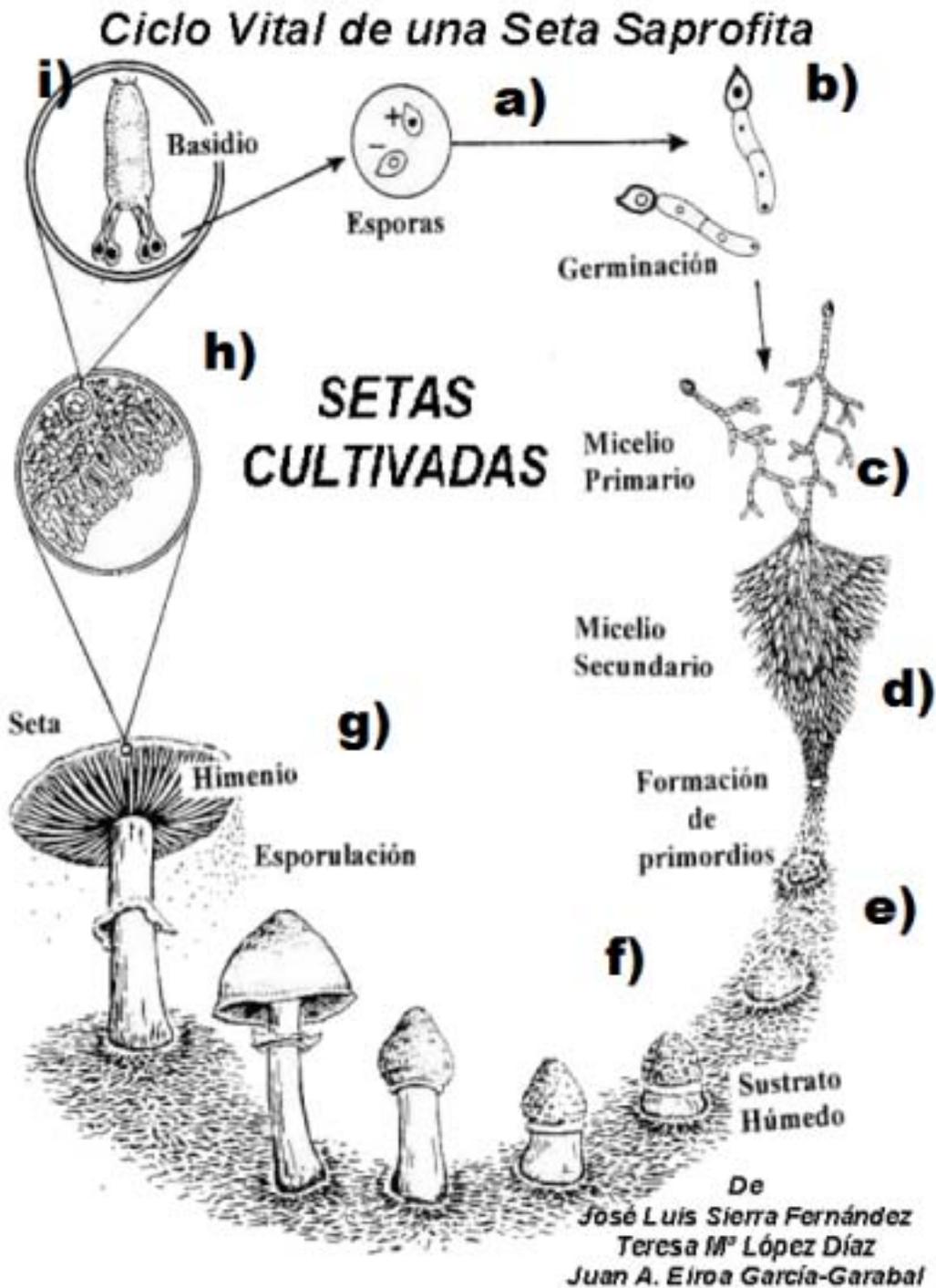


Figura 1. Ciclo de vida de basidiomicetos: a) basidiospora; b) germinación y formación de micelio homocarión; c) fusión de dos micelios homocarión compatibles; d) formación del micelio dicarión; e) formación de primordios; f) desarrollo del carpóforo; g) himenio; h) formación de las basidias; i) basidia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

### **3.2.1. Los basidiocarpos de los hongos seta**

Los tejidos que forman la seta son hifas dicarióticas bien empaquetadas. La inducción y la subsecuente formación de los basidiocarpos es regulada o influenciada por la interacción de un gran número de factores, algunos de los cuales se conocen muy poco, y otros son completamente ignorados, ya que la primera señal morfológica del inicio del basidiocarpo es la formación de pequeños agregados de hifas en las zonas muy ramificadas del micelio dicariótico. En este estado, el primordio del basidiocarpo está compuesto de hifas ampliamente espaciadas, ramificadas y entretejidas. A medida que éste crece, las hifas exteriores forman numerosas cistídias cónicas que dan al primordio una apariencia “espinosa”. El crecimiento y la diferenciación continúan, hasta que aparece el pileo rudimentario. Posteriormente se forma una seta miniatura con un estípite, un pileo y un himenio cubierto de lamelas. Después de esto, hay un agrandamiento muy rápido dando lugar a la aparición del basidiocarpo maduro (Huerta 2002).

### **3.3. Cómo crecen los hongos**

El crecimiento de un hongo es un incremento ordenado de los componentes celulares que involucra un aumento de biomasa. Es un proceso balanceado que implica generalmente el mantenimiento más o menos constante de la composición química de un organismo, va acompañado de procesos de desarrollo y diferenciación, y es muy diferente de la simple acumulación de reservas, alargamiento o engrosamiento físico. El crecimiento puede iniciarse a partir de una espora o de una fracción viable de la hifa, dicho crecimiento sólo se da en la parte apical de la hifa, la cual tiene la capacidad de alargarse alejándose del centro de la colonia. A la parte apical de la hifa fluye protoplasma proveniente de la zona periférica de crecimiento, es la parte que se ubica de manera inmediatamente adyacente al ápice y se caracteriza por aportar protoplasma y enzimas necesarias para el alargamiento celular, además de que sintetiza materiales precursores de pared. Se sabe que la síntesis de componentes celulares, la absorción de agua por la hifa y la presión de turgencia juegan un papel importante en la elongación del ápice; sin embargo poco se sabe sobre el fenómeno de ramificación. Esta característica ocasiona que las células de los hongos (exceptuando las levaduras) tengan una estructura cilíndrica, la hifa, delimitada por una parte que se extienden de manera ramificada para formar un sistema hifal conocido como micelio (Sánchez 2002).

### **3.3.1. Fases de crecimiento *in vitro***

El crecimiento de un hongo varía según el tipo de medio de cultivo. En medio líquido crece solo sobre la superficie si está en reposo; pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. En agitación, los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al presentado por otros organismos, y consta de las siguientes fases: latencia, exponencial, declinación, estacionaria y muerte. Cuando el crecimiento de un hongo se da en un medio sólido en lugar de fase exponencial se presenta una fase de crecimiento más o menos lineal y si se trata de un basidiomiceto, además puede presentarse, según las condiciones, una etapa de fructificación (Lilly y Barnett, 1951 citado por Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

#### **3.3.1.1. Fase de latencia**

La fase de latencia se presenta inmediatamente después de que el hongo ha sido inoculado en el medio de cultivo apropiado para su desarrollo. Es una etapa de adaptación en la que no hay crecimiento aparente, sino más bien síntesis de los componentes celulares necesarios para iniciar la elongación celular. Si el hongo fue dañado durante la siembra, en esta etapa sintetizará pared celular y preparará puntos de crecimiento. La duración de la fase de es muy variable y depende del tipo y del estado fisiológico del hongo, así como del tipo de sustrato y de las condiciones de cultivo. Dicha fase se minimiza o aún puede ser suprimida si un hongo es reinoculado, a partir de una colonia que crece en fase exponencial, a otro medio de características similares (composición, pH, temperatura). La fase de latencia puede, sin embargo, presentarse aún en estas condiciones si el hongo es maltratado durante la siembra (Sánchez 2002).

#### **3.3.1.2. Fase exponencial**

La fase exponencial es alcanzada cuando un hongo crece en medio líquido, después de que se ha adaptado al medio de cultivo y está en capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que éste ofrece. Durante esta etapa el hongo alcanzará la tasa de crecimiento máxima que el sustrato sobre el que crece le permite. Cuando los hongos filamentosos crecen en medio sólido no presentan una fase exponencial, sino más bien presentan una fase de crecimiento lineal. La tasa de crecimiento es una característica muy importante de cada hongo, que varía con las condiciones del medio y que sirve para hacer comparaciones o predicciones sobre el comportamiento entre cepas o sustratos

diferentes. Las adiciones de nutrientes o complementos al sustrato tiene en muchos casos como consecuencia un mejoramiento de la tasa de crecimiento (Sánchez 2002).

#### **3.3.1.3. Fructificación**

Cuando el micelio ha crecido suficientemente sobre el sustrato y las condiciones del medio ambiente lo permiten (temperatura, luz, humedad relativa, cantidad de oxígeno y gravedad), las hifas se agregan para formar cuerpos fructíferos, también denominados basidiomata, basidiocarpos o carpóforos, cuya función específica es producir y diseminar esporas. Los mecanismos que dirigen y regulan la formación de cuerpos fructíferos no son conocidos en la actualidad; sin embargo es claro que su desarrollo requiere de una modificación del comportamiento normal, invasivo del micelio vegetativo y en el que las hifas no tengan un crecimiento divergente, sino que converjan para formar un órgano diferenciado (Sánchez 2002).

#### **3.3.1.4. Fase de declinación *in vitro***

Esta fase se presenta cuando la acumulación de los desechos del metabolismo del hongo alcanzan niveles que se vuelven limitantes para el crecimiento o porque alguno de los nutrientes escasea o se termina. En estas condiciones la tasa de crecimiento máxima no puede ser mantenida y empieza generalmente a disminuir de manera paulatina y depende de la importancia de los factores o nutrientes agotados o acumulados (Sánchez 2002).

La declinación es una fase propicia para que aparezcan mutaciones celulares porque, sobretudo en cultivos puros, se disminuye la presión de selección. Dadas las condiciones adversas del medio durante la declinación, es relativamente frecuente que un organismo pierda algunas capacidades o modifique otras por mutación. Esto explica por qué la resiembra frecuente o sistemática de un organismo en un medio de cultivo, sobre todo sintético, puede conducir rápidamente al agotamiento de la cepa o a la pérdida de la misma (Sánchez 2002).

#### **3.3.1.5. Fase estacionaria y muerte**

La fase estacionaria es el punto en el que el crecimiento cesa, aunque todavía prevalece un metabolismo celular de mantenimiento. Durante esta etapa aún hay consumo de glucosa y otros nutrientes. El hongo en esta fase es aún capaz de reiniciar crecimiento si es sembrado en un medio propicio, aunque tendrá un período de latencia más o menos

largo según las condiciones. Durante la fase estacionaria empiezan a aparecer diversos tipos de enzimas autolíticas que conducen a la muerte del hongo (Sánchez 2002).

### **3.4. México, el mayor productor de hongos comestibles en Latinoamérica**

Actualmente, los volúmenes de producción en México ascienden a más o menos 62,374 toneladas anuales de hongos comestibles frescos. Nuestro país es el mayor productor de Latinoamérica y cuenta con los desarrollos tecnológicos más avanzados, ya que genera alrededor del 80.8% de la producción total de esa región, seguido por Brasil (7.7%) y Colombia (5.2%), ubicándose como el 13° productor a nivel mundial. El monto anual de las operaciones comerciales supera los 200 millones de dólares, generando alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 500,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales. Los hongos comestibles que se cultivan o procesan comercialmente en México son principalmente de los géneros: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Ganoderma*, *Ustilago*, *Grifola* (Martínez *et al.*, 2010).

#### **3.4.1. Producción nacional**

En el período 1991-2011 se observó un incremento de 590.2% en la producción nacional de hongos frescos, pasando de 9,036 toneladas en 1991 a 62,374 toneladas en 2011. Los champiñones blancos y cafés (“portobello”, “portobellini”, “cremini”, “portobela”) representan el 95.1% de la producción nacional. Por su parte, las “setas” representan el 4.86% de la producción nacional de hongos frescos y son cultivados, a pequeña y gran escala, en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán (Martínez *et al.*, 2012).

#### **3.4.2. Biotecnología**

La producción de setas ha dado lugar a un gran número de pequeños productores, dada la sencillez y bajo costo de implementación de su sistema de cultivo, normalmente es temporal, debido a que sólo es una actividad adicional. Sin embargo, una proporción importante de productores rurales generan cosechas inestables o efímeras, ya que no tienen apoyos suficientes de capital y tecnología, ni tampoco planifican adecuadamente la comercialización del producto. En general, se aprovechan grandes cantidades de subproductos agrícolas y forestales como substrato de cultivo, tales como las pajas de trigo, cebada, y sorgo; pulpa de café; bagazos de algodón, caña de azúcar y tequila;

rastrojos de maíz, haba y frijol; fibra de coco; así como de hojas, hojarasca, o cáscaras de diversas plantas. Estos substratos se preparan para su siembra, mediante fermentación aerobia y pasteurización, o por esterilización. Los sistemas de producción utilizan cajas de madera o bolsas de plástico de diferentes tamaños, incubadas verticalmente o en anaqueles. Los cuartos de crecimiento y producción de los hongos comestibles son poco sofisticados y con control rústico de las variables ambientales (luz, humedad relativa y ventilación). Otro aspecto importante, en comparación con otros cultivos convencionales y agroindustrias, es la marcada eficiencia del proceso biotecnológico de producción de hongos comestibles para utilizar y convertir el agua, y la energía en alimento humano (Martínez *et al.*, 2000).

### **3.5. Hongos del género *Pleurotus* “podredumbre blanca”**

Los basidiomicetos de podredumbre blanca constituyen el grupo más hábil de microorganismos a la hora de llevar a cabo una alimentación rápida y efectiva de la lignina. Además, son los únicos organismos capaces de mineralizar este polímero cuando su contenido en la pared vegetal es elevado (Rodríguez 2006).

Los hongos de podredumbre blanca, como en los otros casos, invaden los tejidos vegetales a través del lumen del sistema vascular, secretando una serie de enzimas capaces de degradar la lignina y otros componentes de la madera. Esta maquinaria enzimática versátil coopera con metabolitos secundarios secretados también por estos hongos, permitiéndoles atacar eficientemente la barrera que constituye la lignina (Rodríguez 2006).

Dentro de los denominados hongos de podredumbre blanca se incluyen una gran variedad de especies. Entre ellas se encuentra *Phanerochaete chrysosporium*, organismo modelo en los estudios de biodegradación de la lignina (Schoemaker *et al.*, 1991), a pesar de que solo expresa su sistema ligninolítico durante el metabolismo secundario y en atmósferas saturadas de oxígeno. Sin embargo, en los últimos años el interés por estos hongos se ha diversificado hacia otras especies de podredumbre blanca que, con menos requerimientos fisiológicos, degradan eficientemente la lignina, como por ejemplo *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Phlebia radiata* u hongos pertenecientes al género *Pleurotus* (Rodríguez 2006).

### 3.6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Pleurotus djamor*



Figura 2. *Pleurotus djamor*

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotaceae

Género: *Pleurotus*

Especie: *Pleurotus djamor*

#### a. Características macroscópicas

Hongos de fructificaciones carnosas, en forma de repisas redondas, de 3 a 8 cm de ancho, a veces algo lobuladas, sésiles o con estípote lateral muy corto; color rosa anaranjado en todas sus partes. Superficie lisa, láminas bien definidas. Contexto blanquecino, crece en conjunto sobre árboles podridos (Pérez 2006; Herbario IZTA).

#### b. Características miceliares

No reportadas. Estado anamorfo desconocido.

### **3.7. Factores que afectan el crecimiento de *Pleurotus spp.***

Los hongos, como otros organismos, necesitan para su crecimiento condiciones específicas de temperatura, humedad, pH, luz y aireación. Para cada uno de estos factores, existe un rango delimitado por un punto mínimo y un punto máximo, bajo y sobre los cuales no habrá crecimiento. Describiremos a continuación los requerimientos considerados más importantes (Pérez 2006):

#### **3.7.1. Temperatura**

La temperatura afecta el metabolismo de las células, influye tanto en la capacidad enzimática del organismo, como en fluidez de los lípidos de la membrana celular. La sensibilidad a la temperatura no solo varía entre cepas sino también dentro de la misma según su etapa de desarrollo. Así, es posible y aún frecuente, que un hongo tenga una temperatura óptima de germinación y que ésta sea diferente para el crecimiento micelial o de fructificación. La mayoría de hongos son mesófilos, por lo que crecen a temperaturas entre 5 y 40°C. Generalmente el rango de temperatura óptima se encuentra entre 25 y 33°C para el crecimiento micelial y fructifican a 28°C (Toledo 2008, Pérez 2006, Sánchez 2002).

#### **3.7.2. Humedad**

Al respecto deben de considerarse la humedad del sustrato y la del aire:

El contenido de humedad del sustrato influye directamente sobre el desarrollo de los hongos y afecta la disponibilidad de nutrientes. Así, los niveles inferiores al 50% no serán propicias y superior al 80% tendrá un efecto negativo en el crecimiento de *Pleurotus spp.* El contenido óptimo depende no solo de la especie de hongo que se cultiva, sino también del tipo de sustrato utilizado. En efecto, cada sustrato tiene una capacidad de retención de agua diferente y esto hace que la condición óptima para el crecimiento sea diferente, y no solo afecta la disponibilidad de nutrientes en el sustrato, sino también la disponibilidad de oxígeno. El agua ocupa espacios que pueden ser ocupados por el aire. A niveles excesivos esto se vuelve una limitante para la respiración del hongo (Sánchez 2002).

Dado que los cuerpos fructíferos están formados por un alto contenido de agua y su estructura hifal no les permite retenerla en condiciones adversas, un balance adecuado entre la humedad ambiental y la del hongo es necesaria para evitar que tanto el sustrato como los basidiocarpos se deshidraten. En general, los hongos son muy susceptibles a

las variaciones en la humedad relativa, entre el 60 y 95% se da el crecimiento máximo del micelio de la mayoría de especies de *Pleurotus* (Sánchez 2002).

### **3.7.3. pH**

El potencial de hidrógeno (pH) del medio de cultivo donde crece un hongo tiene una influencia directa sobre éste, porque incide sobre el carácter iónico del medio y directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular; es decir, afecta directamente su metabolismo. Si el pH del sustrato donde crece un hongo no es el adecuado, aunque las condiciones de temperatura y nutrientes sean óptimos, el crecimiento se verá afectado. Por otra parte, el valor es alterado por el crecimiento del hongo, ya que las fuentes de nitrógeno producen cambios importantes, de tal manera que las sales de amonio ocasionan que el medio en el que crece una cepa de *Pleurotus* se acidifique y que las sales de nitrato lo vuelvan alcalino (Sánchez 2002).

Los hongos tienen un rango amplio de pH, en el que pueden crecer, pero la mayoría de ellos prefieren un medio ligeramente ácido para su desarrollo. El pH adecuado para el crecimiento micelial de *Pleurotus* oscila entre 6.0-7.0 y fructifica entre 6.5 y 7.0 (Pérez 2006, Sánchez 2002).

### **3.7.4. Luz**

Aunque se requiere luz para el crecimiento del micelio, cierta cantidad es esencial para la esporulación en muchas especies. Es decir, juega un papel importante en la dispersión de las esporas, ya que las estructuras encargadas de expulsarlas en muchos hongos son fototróficas. Por otra parte, algunas especies requieren de oscuridad total para lograr el crecimiento de cuerpos fructíferos (Sánchez 2002).

En general, las especies de *Pleurotus* para el crecimiento micelial requieren oscuridad y para la fructificación requieren luz de longitudes de onda corta (cargado hacia el color azul del espectro) aproximadamente 150-200 nm (Sánchez 2002).

### **3.7.5. Aireación**

El oxígeno es un elemento de gran importancia para el crecimiento de los basidiomicetos porque son organismos aerobios. Estos presentan requerimientos de oxígeno diferentes según el estado fisiológico en que se encuentren. Para el caso de *Pleurotus spp.*, se ha

notado que la concentración alta en CO<sub>2</sub> estimula la germinación de las esporas y el crecimiento micelial pero inhibe la fructificación (Sánchez 2002).

La mayoría de los hongos son aerobios estrictos y requieren de al menos alguna molécula de oxígeno libre en la atmósfera, es por eso que los cuerpos fructíferos generalmente crecen sobre o cerca de la superficie del sustrato. Se debe tener una buena ventilación, para evitar deformaciones del cuerpo fructífero, las cuales pueden ser desde un ligero alargamiento del estípote, la no formación del píleo o ambas cosas (Pérez 2006).

### **3.7.6. Requerimientos nutricionales**

Un sustrato es conveniente para el crecimiento de un hongo, si contiene todos los requerimientos nutritivos en cantidad suficiente para que éste sintetice sus metabolitos y tome de él la energía que requiere. Los hongos son organismos que se desarrollan naturalmente sobre productos animales o vegetales, estos materiales extremadamente complejos proveen a los hongos de una gran cantidad de nutrientes, principalmente nitrógeno y carbono (Pérez 2006).

#### **3.7.6.1. Nitrógeno**

El nitrógeno es requerido por los hongos para la síntesis de aminoácidos, proteínas y protoplasma, en su ausencia, no hay crecimiento. Los hongos pueden utilizar nitrógeno inorgánico, en forma de nitratos, nitritos o amonio y orgánico en forma de aminoácidos; sin embargo, la mayoría de ellos prefieren las formas orgánicas, por ejemplo muchos basidiomicetos degradadores de madera son incapaces de utilizar nitrato, pero crecen profusamente en fuentes orgánicas (Toledo 2008, Pérez 2006).

#### **3.7.6.2. Compuestos de carbono**

Los compuestos de carbono son necesarios para los hongos porque son la fuente directa de energía para su metabolismo; así mismo, es necesario para la formación de las diferentes partes y estructuras celulares. Dada la importancia que tiene para la vida de la célula, este elemento es el que requiere en mayores cantidades (Toledo 2008, Sánchez 2002). Representan casi la mitad del peso seco de un hongo, lo cual indica la importancia de los compuestos carbonados para la célula fúngica. Entre los carbohidratos, el azúcar que permite el crecimiento de la mayoría de hongos es la D-glucosa; algunos de estos organismos también son capaces de utilizar ácidos orgánicos como fuente de carbono,

pero en general, los hongos crecen deficientemente o no crecen si los ácidos son la única fuente de carbono disponible (Pérez 2006), lo que revisaremos a continuación:

**Polímeros:** la mayoría de los basidiomicetes son considerados “degradadores de madera” porque son capaces de crecer sobre la biomasa proveniente de las plantas leñosas. Las especies de *Pleurotus* son consideradas de pudrición blanca porque son capaces de degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa (Sánchez 2002).

**Azúcares:** los carbohidratos se encuentran entre las fuentes de carbono preferidas por las especies de *Pleurotus*, por ejemplo, la glucosa, la manosa y la galactosa, mientras que la xilosa y la arabinosa producen un crecimiento deficiente. *P. djamor* tiene buen crecimiento en presencia de manosa, fructosa y glucosa. (Sánchez 2002).

**Lípidos:** la adición de ácidos grasos tiene un efecto benéfico para el crecimiento micelial, ya que conforme aumenta el número de carbonos entre C4-C14 y disminuye ligeramente a C14 y C18. Al utilizar ácidos C18, el crecimiento aumenta con el grado de insaturación, siendo el ácido linoleico, el que mejor lo promueve, de este grupo (Sánchez 2002).

### **3.7.7. Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)**

Los hongos del género *Pleurotus* necesitan más cantidad de carbono que de nitrógeno y las relaciones C/N varían de 30/1 a 300/1. La concentración óptima del sustrato depende de la fase en la que se encuentre el hongo, cuando dicha relación es alta favorece el crecimiento micelial y bajas relaciones favorecen el desarrollo de cuerpos fructíferos (Garzón, 2008).

### **3.8. Valor nutricional**

Desde el punto de vista del valor alimenticio de las setas, los hongos son un alimento sabroso, nutritivo y bajo en calorías constituyendo una excelente opción alimentaria. Contienen entre el 10 – 40% de proteínas en base seca, mayores al de la mayoría de los vegetales, según Kumari et al., 2008., los hongos son también una fuente de minerales tales como hierro (Fe), calcio (Ca), sodio (Na), fósforo (P) y potasio (K) (tabla 1). Son ricos en vitaminas especialmente del complejo B, tales como la B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina) y B12; además de vitaminas C y D (tabla 2). Sus proteínas son de alta calidad debido a que tienen a todos los aminoácidos esenciales, tales como, lisina, leucina, valina, isoleucina, entre otros (tabla 3). Los hongos del género *Pleurotus* son rico en carbohidratos, vitaminas, fibra y minerales; y posee un bajo contenido de grasas (tabla 4) (Gaitán et al., 2006).

Tabla 1. Composición del hongo de *Pleurotus spp.* (Gaitán *et al.*, 2006).

COMPONENTE	VALOR	UNIDAD DE MEDIDA
<b>Proteína</b>	26	% en masa seca
<b>Grasa</b>	0.9 – 1.8	% en masa seca
<b>Carbohidratos</b>	57 – 61	% en masa seca
<b>Fibra</b>	11.9	% en masa seca
<b>Calcio</b>	0.02	% en masa seca
<b>Fósforo</b>	1.40	% en masa seca
<b>Hierro</b>	0.02	% en masa seca
<b>Valor energético</b>	367	Kcal/g

Tabla 2. Contenido de vitaminas de *Pleurotus spp.* (Martínez *et al.*, 2004).

COMPONENTE	CONTENIDO EN BASE SECA (mg/kg)
<b>Vitamina A (retinol)</b>	0.035
<b>Vitamina B<sub>1</sub> (tiamina)</b>	5.700
<b>Vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina)</b>	25
<b>Vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina)</b>	5.500
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (cobalamina)</b>	0.006
<b>Vitamina C (ácido ascórbico)</b>	200
<b>Vitamina D<sub>2</sub> (ergosterol)</b>	0.092
<b>Vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol)</b>	0.236

Tabla 3. Perfil de aminoácidos esenciales de *Pleurotus sp.* (Bermúdez *et al.*, 2003).

<b>Aminoácidos esenciales</b>	<b>Base húmeda (mg/100g hongo fresco)</b>
<b>Cisteína</b>	28
<b>Fenilalanina</b>	111
<b>Isoleucina</b>	82
<b>Leucina</b>	139
<b>Lisina</b>	126
<b>Metionina</b>	35
<b>Tirosina</b>	219
<b>Treonina</b>	106
<b>Valina</b>	112

Tabla 4. Contenido de minerales en *Pleurotus sp.* en peso seco (mg/kg) (Martínez *et al.*, 2004).

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONTENIDO EN BASE SECA</b>
<b>Cenizas</b>	9.4%
<b>Minerales y elementos traza (mg/kg)</b>	
<b>Aluminio</b>	16.30
<b>Boro</b>	4.97
<b>Bario</b>	1.42
<b>Calcio</b>	684
<b>Cadmio</b>	0.59
<b>Cobalto</b>	<0.002
<b>Cromo</b>	1.17
<b>Cobre</b>	10.80
<b>Hierro</b>	77.50
<b>Potasio</b>	34.84
<b>Magnesio</b>	1.64
<b>Manganeso</b>	9.14
<b>Molibdeno</b>	<0.005
<b>Sodio</b>	189
<b>Fósforo</b>	7.46
<b>Selenio</b>	0.50
<b>Estroncio</b>	5.80
<b>Titanio</b>	0.43
<b>Vanadio</b>	0.16
<b>Zinc</b>	80.20

### **3.9. Valor medicinal**

Los hongos comestibles han sido utilizados desde tiempos inmemoriales por sus propiedades nutricionales y farmacológicas. Estudios recientes en diferentes especies de *Pleurotus spp.* han mostrado que tener actividades terapéuticas, tales como antitumoral, inmunomoduladora, antígenotóxica, anti-inflamatoria, hipocolesterolemica, antihipertensiva, antidiabética, antimicrobiana y antiviral (Gregori 2007; Preeti *et al.*, 2012).

No obstante, las investigaciones en este campo se han enfocado fundamentalmente al estudio de su valor dietético y, en consecuencia, existe poca información respecto a la actividad antioxidante y su posible uso en la terapia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. En este sentido, se puede corroborar cómo los hongos superiores representan una fuente natural de potentes metabolitos bioactivos antioxidantes. Al igual que en el reino vegetal, también en los hongos han comenzado a ser identificados metabolitos fenólicos que exhiben ventajas antioxidantes, y en las últimas décadas han obtenido extractos a partir de hongos y son ampliamente comercializados (Bermúdez 2003, Martínez 2010), resulta particularmente interesante desde el punto de vista nutricional por la presencia de compuestos con actividad antioxidante (Gregori 2007). Algunas investigaciones por diferentes regiones del mundo confirman que el hongo *Pleurotus* tiene alto contenido nutricional y también contiene varios compuestos bioactivos incluyendo terpenoides, esteroides, fenoles, alcaloides, lectinas y nucleótidos, muchos de los cuales han sido aislados e identificados en el cuerpo fructífero y micelio (Deepalaksmi *et al.*, 2014).

### **3.10. Metabolitos secundarios**

Si se considera la actividad metabólica de un cultivo microbiano a lo largo de toda la curva de crecimiento, se diferencian aquellos procesos metabólicos asociados al crecimiento celular (metabolismo primario) de aquellos que tienen lugar en la fase estacionaria, los primeros incluyen todas las rutas bioquímicas e intermediarios en la obtención de energía, los cuales son producidos en la etapa activa de crecimiento o fase exponencial, siendo algunos de ellos ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, entre otros; mientras que los segundos son importantes una vez que ha cesado el crecimiento de la biomasa (metabolismo secundario), el cual produce diferentes tipos compuestos que no poseen

una importancia vital para la misma, todos ellos reciben la denominación de metabolitos secundarios (Parés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2013).

Los metabolitos secundarios se definen por las siguientes características: a) productos naturales que tienen una distribución taxonómica restringida; b) se forman una vez que el crecimiento se ha detenido; c) suelen sintetizarse como una mezcla de compuestos químicamente relacionados (Parés *et al.*, 2002).

Estos metabolitos son generados por diferentes rutas bioquímicas estableciéndose a partir de esto la siguiente clasificación:

1.-Productos derivados de glucosa. En los cuales esta molécula llega a ser parte estructural.

2.-Productos relacionados con los nucleósidos. La vía de la pentosa fosfato (PF) genera ribosa para la síntesis de nucleósidos, la mayoría de los cuales tienen propiedades antibióticas.

3.-Productos derivados de la vía shikimato-corismato, donde se forma el ácido shikímico, a partir de la condensación de la eritrosa-4-fosfato obtenida de la vía PF con el fosfoenolpiruvato proveniente de la vía Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) el cual es un intermediario para la formación de diversos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y otros metabolitos secundarios como el ácido *p*-amino benzoico, cloramfenicol, novobiocina, fenazinas y picocianinas.

4.-Vía del policétido. La biosíntesis del policétido es muy similar a la de ácidos grasos, en la cual intervienen complejos enzimáticos denominados policétido-sintasas, ocurriendo la síntesis a partir de reacciones de condensación entre moléculas de acetato y malonato con la respectiva pérdida de CO<sub>2</sub>, produciéndose diferentes compuestos con actividad biológica.

5.-Terpenos y esteroides. Son compuestos sintetizados mediante reacciones de polimerización de moléculas de isopreno por la vía del ácido mevalónico, como en el caso de carotenoides (astaxantina).

6.-Productos derivados de aminoácidos. Los aminoácidos provienen de diferentes productos del catabolismo, por lo tanto, los metabolitos secundarios pueden estar formados de uno o más aminoácidos, como el caso de la hadacidina (Cortés *et al.*, 2013).

### **3.10.1. Funciones de los metabolitos secundarios**

En primer lugar, hay que indicar que su biosíntesis se deriva de intermediarios o monómeros del metabolismo primario. Esto implica la existencia de enzimas específicas

que posibilitan que una de tales moléculas, siguiendo una ruta determinada, se transforme en el metabolito secundario en cuestión (Parés *et al.*, 2002).

Otra característica importante es que el metabolismo secundario tiene una prioridad menor que la del propio crecimiento. La información genética necesaria para producir metabolitos secundarios solamente se expresa cuando el crecimiento se halla restringido. La naturaleza de la limitación del crecimiento también afecta al nivel de expresión. Finalmente cabe mencionar que, además de un sistema de regulación en relación de parámetros ambientales, existen también mecanismos específicos que regulan la producción de un metabolito secundario (Cortés *et al.*, 2013).

La duración de la etapa de producción varía en función de la naturaleza del metabolito secundario, del organismo y del medio. Generalmente el periodo de producción del metabolismo secundario oscila entre una mitad y el doble del tiempo de la fase de crecimiento exponencial (Parés *et al.*, 2002).

La terminación súbita de la producción del metabolismo secundario se ha atribuido a las siguientes causas:

1. Aparición de un proceso de diferenciación celular, que genera células no productoras del metabolito.
2. Inhibición por retroalimentación (“feedback”) por el propio metabolito secundario sobre la sintasa clave.
3. Represión de la síntesis de un enzima clave por el propio metabolito junto a la progresiva desnaturalización de la enzima presente.
4. Agotamiento de un precursor del metabolito secundario (Parés *et al.*, 2002).

### **3.10.2. Composición química de los metabolitos secundarios**

Raistrick (1931) fue el primero en señalar la naturaleza química extraordinariamente específica de algunos productos poco usuales de los hongos, señaló también el hecho de que algunas veces son producidos por determinadas cepas de una especie, y otras por una sola especie o por muy pocas especies dentro de un género (Parés *et al.*, 2002).

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios de origen microbiano, los cuales, así como la capacidad de producción son apenas investigados, también se han reportado componentes macromoleculares aislados de hongos superiores como los polisacáridos, glicoproteínas y ácidos nucleicos con actividad biológica (Brizuela *et al.*, 1998).

Los hongos silvestres pueden llegar a ser uno de los candidatos útiles en la búsqueda de compuestos bioactivos con propiedad antioxidante, ya que se ha logrado extraer de estas fuentes compuestos fenólicos, tecoferoles, ácido ascórbico y carotenoides (Preeti *et al.*, 2012).

### 3.11. Polifenoles

#### 3.11.1. Origen, estructura y distribución de los polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles o compuestos fenólicos. (figura 3; Barberán 2003; Quiñones *et al.*, 2012).

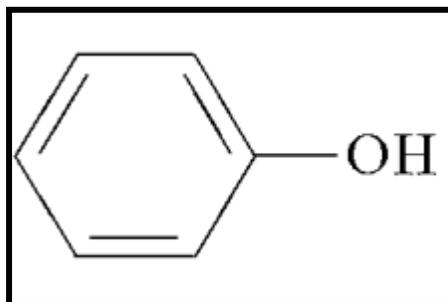


Figura 3. Estructura de un fenol.

Los compuestos fenólicos naturalmente son producidos como productos finales acumulados de las vías shikimato y acetato, y pueden ir de moléculas relativamente simples (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) en compuestos altamente polimerizados (ligninas, melaninas, taninos), y flavonoides que representan el más común y ampliamente subgrupo distribuido, los compuestos fenólicos principales que se encuentran en los hongos son los ácidos fenólicos (Martínez *et al.*, 2002; Preeti *et al.*, 2012).

La ruta del ácido shikimico se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fosfato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis (Quiñones *et al.*, 2012).

La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shikimico como de la ruta de los poliacetatos. Este es

el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides (figura 4; Quiñones *et al.*, 2012).

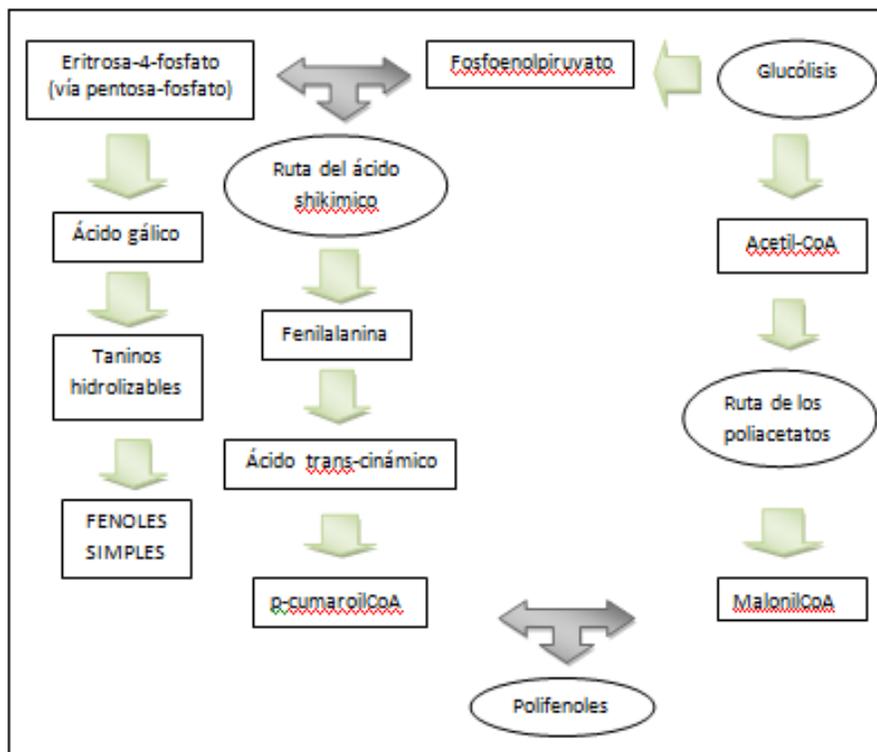


Figura 4. Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles. CoA=Coenzima A (Quiñones *et al.*, 2012).

Numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez o el grado de conservación, pueden afectar al contenido total de polifenoles. El clima (exposición al sol, precipitaciones, etc.) o factores agronómicos (diferentes tipos de cultivos, producción de fruta por el árbol, etc.) juegan un papel fundamental. La exposición a la luz es, en particular, uno de los principales condicionantes para determinar el contenido de la mayoría de los compuestos. El grado de conservación puede también determinar el contenido fenólico fácilmente oxidables, permitiendo la formación de más o menos sustancias polimerizadas que afectan al color y a las características organolépticas de los alimentos. La conservación en frío, sin embargo, no afecta dichas sustancias. El contenido de estos metabolitos en los alimentos esta también influenciado por los métodos culinarios de preparación; así, dichas sustancias en las frutas y de los vegetales pueden disminuir por el simple hecho de pelar los alimentos, ya que estas sustancias están a menudo presentes en altas concentraciones en las partes externas de los mismos. La cocción de los alimentos puede disminuir hasta un 75% el contenido inicial de polifenoles (Martínez *et al.*, 2008 y Escamilla *et al.*, 2009).

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber. En realidad, en los alimentos, prácticamente todos los flavonoides, excepto los flavonoles, presentan formas glucosiladas. El destino de los glucósidos en el estómago aun no está claro. La mayoría de los glucósidos resisten probablemente la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino. Estas sustancias deben hidrolizarse por enzimas intestinales como la  $\beta$ -glucosidasa y la lactasa-florizin hidrolasa, o deben ser degradadas por la microflora del colon antes de poder asimilarse (Quiñones *et al.*, 2012).

Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren, por tanto, diversas modificaciones. De hecho, estos compuestos se conjugan en las células del intestino y posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación y/o glucuronidación en el hígado. Como consecuencia de estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y en los tejidos son muy distintas de las que están presentes en los alimentos, y esto dificulta la tarea de identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica (Quiñones *et al.*, 2012).

Como consecuencia de su acción antioxidante, los polifenoles poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos. Además de las propiedades vasodilatadoras que favorecen el control del tono arterial, se han descrito otras propiedades de los flavonoides que favorecen también su efecto cardioprotector (Berberán 2003).

### **3.12. Radicales libres**

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración especial que genera una alta inestabilidad, por lo que son muy reactivos; ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que puede destruir células (Rodríguez 2001).

Los radicales libres producen daño a diferentes niveles en la célula:

- Oxidación de ácidos nucleicos y nucleótidos. La interacción de radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo el sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación. Esto conduce a la producción de genes mutados y, por ende, de proteínas disfuncionales. Las modificaciones de las bases se deben, en gran parte, a los metales de transición, fundamentalmente al ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que se encuentra unido al ADN y que, en presencia del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), genera el radical hidroxilo  $\cdot\text{OH}$  que modifica las bases del mismo. El hidroxilo puede atacar tanto purinas como pirimidinas, además de generar rupturas en las cadenas de ADN (Velázquez *et al.*, 2004).
- Oxidación de proteínas. Uno de los radicales más reactivos a la estructura de proteínas es el óxido nítrico (NO). Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas, aunque algunas son más vulnerables que otras como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina, el triptofano, la histidina, la metionina y la cisteína. En consecuencia, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones en la estructura terciaria, que puede acompañarse de una fragmentación química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica (Velázquez *et al.*, 2004).
- Peroxidación de lípidos. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. Éstas son ricas en fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres. Una molécula reactiva, como es  $\cdot\text{OH}$ , ataca un ácido graso, constituyente de triacilgliceroles o fosfoacilgliceroles. Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, ésteres, alcoholes. Este proceso repetitivo conduce a la membrana a perder sus propiedades fisicoquímicas y culmina con la muerte de la célula (Velázquez *et al.*, 2004).

Una vez que el radical se genera tiene una vida media de microsegundos, corto lapso de tiempo en el que es capaz de interactuar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. No son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas. Los procesos normales del organismo los producen por ejemplo el metabolismo. No todos son

peligrosos pues, por ejemplo, las células del sistema inmune crean radicales libres para matar bacterias y virus, pero si no hay un control suficiente por los antioxidantes, las células sanas pueden ser dañadas (Avello 2006).

### 3.12.1. Biomecanismos de formación de radicales libres

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical  $\cdot\text{OH}$  que es generado cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  entra en contacto con iones cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) o iones hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ); ya que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los complejos metálicos están presentes en humanos, es lógico asumir que el  $\cdot\text{OH}$  puede ser formado *in vivo*. Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace (Maldonado *et al.*, 2010).

Si más del 95% del  $\text{O}_2$  consumido por las células de nuestro organismo es reducido vía acuosa, citocromo oxidasa mitocondrial, completamente a  $\text{H}_2\text{O}$  durante la respiración mitocondrial, un pequeño porcentaje (<5%) es convertido a ERO. Una vez que se ha formado el radical libre en la reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de ceder el electrón a cualquier otro compuesto, originándose nuevos radicales, lo cual constituye la reacción de propagación en cadena que puede amplificarse tanto, que llegue a afectar a los tejidos corporales (Maldonado *et al.*, 2010).

### 3.12.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)

El oxígeno es indispensable para los organismos aeróbicos, pero a su vez es potencialmente tóxico para todos los seres vivientes. El oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, su reactividad resulta de esta propiedad biradical. Puede dar origen a las especies reactivas del oxígeno (ERO), es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales, que engloban radicales libres como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el anión peróxido ( $\text{O}_2^{-2}$ ), el radical perhidroxilo ( $\text{HO}\cdot_2$ ) y el  $\cdot\text{OH}$  y

compuestos no radicales, tales como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el ozono ( $\text{O}_3$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{ClOH}$ ). La capacidad prooxidante de cada radical libre está determinada por factores como: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. De este modo, el radical hidroxilo reaccionará con cualquier molécula cercana, dada su elevada reactividad y baja especificidad y su peligro dependerá del compartimento celular en el que se origine o las moléculas a las que ataque. Especies menos reactivas, como el  $\text{O}_2^{\bullet}$ , reaccionan de forma mucho más específica y selectiva, afectando a enzimas como la xantino oxidasa y la aldehído oxidasa (Maldonado *et al.*, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno se forman a partir de muchas moléculas orgánicas como las quinonas; pero los más importantes son derivados de las moléculas de  $\text{O}_2$ , así:

A. Anión  $\text{O}_2^{\bullet -}$ : es el producto de la reducción monovalente de oxígeno molecular.

B. Radical hidroxilo  $\text{OH}^{\bullet}$ : Procede de la rotura del enlace covalente entre el oxígeno y un hidrógeno de una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ . Este radical es de vida media más corta y también el más reactivo por el potencial redox, porque cuando entra en contacto con otra molécula vecina en menos de un microsegundo la altera (Rodríguez 2001).

Por otra parte, el representante más sobresaliente de las ERN es el óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), ya que interviene en diversas funciones biológicas, participa como constituyente del factor relajante derivado del endotelio, el cual puede relajar la musculatura lisa vascular, inhibir la agregación plaquetaria y disminuir/inhibir la transmisión del mensaje neuronal; también es importante en la repuesta inmune, pues los macrófagos producen óxido nítrico como parte de sus mecanismos citotóxicos. Bajo ciertas condiciones el  $\text{NO}^{\bullet}$  puede ser convertido a otras ERN, tales como: el catión nitrosilo ( $\text{NO}^+$ ), anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ). (Maldonado *et al.*, 2010).

Reacción progresiva de los radicales libres: al reaccionar un radical libre sobre una molécula vecina, ésta se transforma en radical libre, al ir en busca de un electrón "estabilizador", es así como comienza la "reacción en cadena" (Gutiérrez 2006).

Los pro-radical son sustancias que no siendo radicales libres, al contacto con otra especie química o por su alta inestabilidad química, tienen la posibilidad de convertirse o generar radicales libres (Gutiérrez 2006).

### **3.12.3. Fuentes fisiológicas de los radicales libres**

El metabolismo celular normal es la fuente primordial de los radicales libres.

1. La mitocondria constituye la principal fuente de radicales libres. Éstos se producen a nivel de la cadena de transporte de electrones ( $e^-$ ) y fosforilación oxidativa. Este

transporte es a través de la membrana interna mitocondrial, en donde se genera un gradiente electroquímico de protones que aporta la energía necesaria para producir adenosin trifosfato (ATP). En el proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de  $e^-$ , lo que le confiere en más del 95% de estas reacciones un total de 4  $e^-$  de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2  $e^-$  al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres. Otra fuente son los lisosomas, la membrana nuclear, citoplasmática y el retículo endoplasmático (Ramos *et al.*, 2006).

2. La Fagocitosis: es una fuente endógena y está constituida por el metabolismo de los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) que poseen enzimas como la proteasa y las nucleasas que generan básicamente peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin es destruir elementos extraños como bacterias y virus (Zentella *et al.*, 1996). Los leucocitos polimorfonucleares son otra fuente importante de radicales, al activarse por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleucinas, etc). Los leucocitos poseen en la membrana la enzima NADPH oxidasa, que en presencia de hierro se transforma en un potente tóxico ión oxidrilo  $\cdot\text{OH}$ . Esta situación se da en los procesos inflamatorios (Ramos *et al.*, 2006).

3. Síntesis de prostaglandinas: en la síntesis de prostaglandinas y más específicamente en la fase de transformación del ácido araquidónico y endoperóxidos por la acción de la cicloxigenasa se producen los radicales libres  $\cdot\text{OH}$  (Zentella *et al.*, 1996).

4. Las irradiaciones: los rayos X y gamma producen radicales libres por provocar radiólisis del agua contenida en los tejidos expuestos y conducen en presencia de  $\text{O}_2$  a la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y de radicales  $\cdot\text{OH}$ , los tejidos más involucrados son la piel y sobretodo el ojo por estar expuestos directamente y por la intensidad del metabolismo (Zentella *et al.*, 1996).

5. Los peroxisomas, organelos del citosol muy ricos en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas y peróxidasas) y transformado en agua (Ramos *et al.*, 2006).

6. La enzima xantina deshidrogenasa, ésta predomina en los endotelios normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del  $\text{Ca}^{+}$ , etc) y genera  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Ramos *et al.*, 2006).

Sin embargo el organismo está luchando contra radicales libres a cada momento del día, pero el problema se produce cuando tiene que tolerar de forma continuada un exceso de radicales libres, que por lo general son producidos sobre todo por contaminantes externos que entran a nuestro cuerpo. Los elementos del medio ambiente que crean radicales libres como la producción industrial, la contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, radiación, medicamentos, aditivos químicos en los alimentos procesados, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres que ingerimos o inhalamos (González 2006).

El exceso de radicales no puede ser eliminado por el cuerpo y, en su labor de captación de electrones, los radicales libres dañan las membranas y ácidos nucleicos de nuestras células, llegando finalmente a destruir y mutar su información genética, facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades. La acción de los radicales libres está ligada al cáncer así como al daño causado en las arterias por el colesterol "oxidado", lo que relaciona directamente estas moléculas con las enfermedades cardiovasculares (González 2006).

Se puede apreciar que los radicales libres se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos celulares de defensa, sin embargo, en situaciones patológicas, esta producción se incrementa y provoca el estado de estrés oxidativo (EOx).

### **3.13. Sistemas de defensa antioxidantes**

Un antioxidante, es cualquier sustancia que presente en bajas concentraciones, y en comparación con el oxidante, retarda o inhibe la oxidación de un sustrato, el cual incluye a lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. Pueden actuar en las formas siguientes:

1. Disminuyendo la concentración de oxidantes.
2. Evitando la iniciación de la reacción en cadena al "barrer" (cubrir o detener una reactividad química muy alta), los primeros radicales libres que se forman.
3. Uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas.
4. Transformando los peróxidos en productos menos reactivos.
5. Deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres (Dorado *et al.*, 2003).

Entre éstos se incluyen sistemas enzimáticos como las enzimas derivadas del sistema citocromo-oxidasa, las superóxido dismutasas (Cu-ZnSOD y MnSOD), las catalasas y peroxidasas como la glutatión-peroxidasa y la glutatión-reductasa. Así como sistemas no enzimáticos, como las vitaminas A, C, E, ácido úrico, aminoácidos como, glicina y taurina,

y el tripéptido glutatión, etc. a los que se denominan barredores (scavengers) de radicales libres. En general todos los radicales libres son electrófilos (que aceptan electrones), causando la producción de otro radical libre menos reactivo y todavía inestable que reacciona con otra molécula para producir otro radical libre, continuando así una reacción en cadena (Dorado *et al.*, 2003).

Los barredores de radicales libres reaccionan con éstos, formando radicales libres que terminan esta reacción en cadena. Los barredores pueden definirse como aquellas sustancias que donan e- a otras, reduciéndolas y haciéndolas menos reactivas (Dorado *et al.*, 2003).

Los sistemas antioxidantes trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos, por ejemplo en los sistemas enzimáticos el  $O_2^{\bullet}$  al ser metabolizado por la SOD se produce  $H_2O_2$ , los peróxidos a su vez son metabolizados hasta  $H_2O$  y  $O_2$  por la catalasa o la glutatión peroxidasa que actúa en forma acoplada con la glutatión reductasa. Estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, en ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales como la contaminación atmosférica (Dorado *et al.*, 2003).

### **3.14. Antioxidantes**

Para equilibrar la respuesta oxidante el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de radicales libres. Cuando un antioxidante colisiona con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los radicales libres. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años. Los antioxidantes pueden ser de origen endógeno (sintetizados por el organismo) y exógeno (provenientes de fuentes externas) (Avello *et al.*, 2006).

Los antioxidantes obtenidos a través de la dieta, pueden actuar de dos formas: primero, previniendo la generación excesiva de radicales libres, evitando así que se produzca el daño celular por efecto del estrés oxidativo. Y segundo, después de que se ha producido el daño, los antioxidantes pueden controlar los niveles de radicales libres evitando que el daño continúe avanzando y con ello algunos síntomas de las enfermedades producidas por el efecto del estrés oxidativo pueden disminuir (Delgado *et al.*, 2010).

### **3.15. Estrés oxidativo**

Cuando por alguna razón aumenta en exceso la producción de radicales libres en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser ineficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidativo, en el cual existe daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a la muerte celular. Los radicales libres oxidan muchas estructuras biológicas, dañándolas y por ello se han considerado como una importante causa del envejecimiento, el cáncer, la aterosclerosis, los procesos inflamatorios crónicos y las cataratas, entre otros (Zentella *et al.*, 1996).

En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. Sin embargo en mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo (Avello *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo ocurre en los organismos que, por mala nutrición, enfermedad u otras causas, pierden el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes. (Zentella *et al.*, 1996).

#### **3.15.1. Estrés oxidativo y las enfermedades crónico degenerativas**

Tal deterioro celular producido por el estrés oxidativo es responsable de diversas enfermedades crónico degenerativas, en donde hay una asociación directa o indirecta con la exposición a los radicales libres. Ejemplos de estas patologías son: el Alzheimer, Parkinson, lesión cerebral hipertensiva, distrofia muscular, esclerosis múltiple, cáncer, catarogénesis, degeneración de la retina, fibroplasia retrolental, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, diabetes mellitus, síndrome metabólico, anomalías cardiovasculares, hipertensión, trastornos nefrológicos, enfisema pulmonar, infarto, artritis reumatoide, anemia, hepatitis, pancreatitis, enfermedad de Werner (envejecimiento prematuro), la aparición de arrugas prematuras y la resequedad de la piel, disfunción endotelial, dermatitis, entre otras (Delgado *et al.*, 2010).

Los polifenoles son abundantes micronutrientes en la dieta, y está surgiendo evidencia de su papel en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Los efectos en la salud de polifenoles dependen de la cantidad consumida y sobre su biodisponibilidad (Manach *et al.*, 2004).

#### 4. ANTECEDENTES

Bermúdez *et al.*, 2007 evaluaron el crecimiento vegetativo de dos cepas de *Pleurotus sp.*, en donde utilizaron un medio sólido natural de extracto de pulpa de café suplementado con glucosa, 20 g/L (ELP), y observaron mejor crecimiento micelial, en comparación con los medios sólidos sintéticos: extracto de malta (AEM) y agar de papa dextrosa (ADP), para la obtención de inóculo. También evaluaron la producción y calidad de los cuerpos fructíferos de las dos cepas de *Pleurotus sp.*, en el cual emplearon como sustratos pulpa de café, viruta de cedro y la mezcla de ambos en proporciones (1:1), donde se lograron mayores producciones con el sustrato de pulpa de café. Sin embargo también se hace referencia a tener buenos índices de productividad al emplear la mezcla de sustratos pulpa de café: viruta (1:1).

Aguilar, 2007 evaluó la obtención de “semilla” a partir de micelio de cinco cepas de *Pleurotus spp.* (ECS127R, IE200, RP, IE202, PCM) crecidas tanto en medio sólido como líquido, en la cepa IE200 se obtuvo mayor producción de biomasa y mejor rendimiento en medio líquido, observando que el medio con mayor contenido en carbohidratos facilitó el crecimiento micelial. Para la fructificación de ésta cepa en la etapa de “semilla”, la invasión micelial en trigo, fue más rápida cuando el micelio fue crecido en medio líquido, en comparación con el crecido en sólido, la diferencia fue de tres días. Sin embargo en los tiempos de cultivo para la fructificación de la cepa en sustrato no presentaron diferencias estadísticas entre ambas formas de producción de semilla.

Ríos *et al.*, 2010 evaluaron medios de cultivo sólidos alternativos para la propagación de *P. ostreatus*, los cuales fueron hechos con extracto de papa 200 g y 400 g/L de medio, adicionados de 15 g de azúcar, la variante fue que utilizaron tres pH 4.5, 5 y 5.5, para comparar el crecimiento micelial con dos medios de cultivo sólidos extracto de salvado de trigo (EST) y agar de papa dextrosa (APD). Observaron el pH influyó sobre el crecimiento radial, mientras que la concentración de papa no afectó el crecimiento. En la obtención de semilla utilizaron grano de cebada, la cual fue adecuada para la propagación del micelio de *P. ostreatus*. En la etapa de fructificación no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Salmones *et al.*, 2007 determinaron la relación entre velocidad de crecimiento micelial y producción de carpóforos de diferentes cepas de *Pleurotus* (*P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*). Dentro de los resultados de parámetros de productividad, las eficiencias biológicas fluctuaron entre 16.8 a 75.6% y las tasas de producción entre 0.34 a 1.68%. La mayoría de los basidiomas presentaron píleos de 5 a 15 cm de diámetro; concluyeron que

la rápida velocidad de crecimiento micelial de las cepas no repercutió en el desarrollo de las fructificaciones.

Salmones *et al.*, 2004 evaluaron la producción de *P. djamor* Fr. Boejin, *P. djamor roseus* y *P. salmoneostramineus*, cultivadas sobre paja de cebada. En promedio se obtuvieron de 3 a 5 cosechas alcanzando eficiencias biológicas de 53.6 a 86.4%, mientras que las tasas de producción fueron de 0.89 a 1.44%. El tamaño de las fructificaciones varió entre 2 a 20 cm de diámetro de píleo, predominando los menores de 10 cm.

Chirinang, *et al.*, 2009 trabajaron con *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* utilizaron extracto acuoso y extracto etanólico, para determinar el contenido de fenoles totales y la propiedad antioxidante. Observaron que el extracto acuoso de *P. ostreatus* presentó mayor contenido fenólico  $42.47 \pm 2.27$  GAE<sub>s</sub> / g, y también mostró mayor captación de radicales libres. Lo cual lo atribuyen a que contiene aminoácidos con actividad antioxidante y fibra dietética soluble en agua.

Guzmán *et al.*, 2009; a partir del extracto etanólico obtenido del hongo silvestre *P. djamor*, evaluaron la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS encontrando valores de CE<sub>50</sub> de 115.5 µg/mL y 29.37 µg/mL, respectivamente. Por tanto, sugieren que *P. djamor* puede ser empleado como una fuente de antioxidante natural.

Kim *et al.*, 2009 determinaron la actividad antioxidante y anticancerígena de setas de diferentes colores, *P. ostreatus* (gris oscuro), *P. cornicopie* (amarillo) y *P. salmoneostramineus* (rosa), en extractos metanólicos. La cepa de color amarilla mostró el mayor contenido de fenoles con 39.3 mg GAE/g, seguido de la cepa rosa con 30.1 mg GAE/g y por último la cepa gris con 21.2 mg GAE/g. En la actividad antioxidante a partir de una concentración de 2 mg/mL, las actividades de captación de radicales fueron 84.4% para la cepa amarilla, en la rosa 54.5% y 29,0% en la gris oscuro, respectivamente. Por otra parte, los extractos de las cepas gris oscuro y rosa tuvieron mayor efecto supresor contra el crecimiento de la línea celular de cáncer de colon humano HT-29; mostraron que la actividad antioxidante varió en forma directamente proporcional al contenido de polifenoles, pero no así su actividad anticancerígena.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El contenido de polifenoles se ha reportado en los hongos comestibles de distintas especies, de entre las cuales se encuentran las del género *Pleurotus*, han ocupado la literatura reciente. Una de las especies es *P. djamor*, para la que se ha reportado actividad antioxidante. Sin embargo, aún no se cuenta con información suficiente de los posibles cambios que existan durante el proceso de crecimiento y fructificación, bajo diferentes condiciones de cultivo.

De ahí radica la importancia del presente trabajo, ya que al estandarizar técnicas de cultivo y cuantificación de polifenoles, se podrá conservar y manejar las cepas del género *Pleurotus*, eligiendo el medio de cultivo adecuado para la obtención de biomasa y un mayor contenido fenólico; otro factor importante es el sustrato en el cual se producen los hongos del género *Pleurotus* ya que dependiendo del contenido nutrimental del sustrato donde se desarrollen los carpóforos, estos desarrollarán diferentes metabolitos secundarios, y obtener los cuerpos fructíferos con las mejores cualidades antioxidantes.

Por lo tanto, el interés del presente trabajo es evaluar la producción y contenido fenólico total de *P. djamor* en medios de cultivo con diferente composición nutrimental así como su efecto en la actividad antioxidante.

## 6. HIPÓTESIS

- a) Los medios de cultivo con diferente composición nutrimental influye en la producción de la cepa de *P. djamor*.
- b) La diferente composición nutrimental de los medios de cultivo influyen en el contenido de fenoles totales de micelio y basidiocarpo de *P. djamor*.
- c) La diferente composición nutrimental de los medios de cultivo influyen en la actividad antioxidante del micelio y basidiocarpo de *P. djamor*.

## 7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del contenido nutrimental en diferentes medios de cultivo sobre la producción y contenido de polifenoles en *Pleurotus djamor* así como su efecto en la actividad antioxidante.

### Objetivos particulares

- Determinar taxonómicamente la cepa de *Pleurotus djamor*.
- En diferentes medios de cultivo con diferente composición nutrimental:
  - Comparar la cinética de crecimiento en micelio de *Pleurotus djamor*.
  - Calcular los parámetros de productividad en basidiocarpos de *Pleurotus djamor*.
  - Determinar el contenido de fenoles totales del extracto etanólico de micelio y basidiocarpos de *Pleurotus djamor*.
  - Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de micelio y basidiocarpos de *Pleurotus djamor*.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1. Material biológico

En el presente trabajo se utilizó la cepa CMIZT-13 del hongo *Pleurotus djamor*, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Aplicada (cabecera L-421), del Jardín Botánico en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Era necesario activarla (Sánchez, 2001), para ello se realizaron resiembras en medio de cultivo de malta-agar-levadura en cajas Petri, con las siguientes proporciones: agar al 2%, malta al 1.5% y levadura al 0.15%, a temperatura ambiente. Se mantuvieron en observación. La fructificación de la cepa CMIZT-13 fue enviada para su determinación taxonómica al herbario IZTA en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, misma que fue realizada por la M. en C. Irene Frutis Molina.

### 8.2. Medios de cultivo sólido.

Para el crecimiento de la cepa de *P. djamor* se utilizaron los siguientes medios de cultivo: medio A, B y M. En la tabla 5 se indican la composición de cada uno.

Tabla 5. Composición nutrimental para los medios de cultivo sólidos (g/100mL).

<b>Medios de cultivo</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>M</b>
<b>Extracto de levadura</b>	-	0.2	0.2
<b>Glucosa</b>	1	1	-
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0.05	0.05	-
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.08	0.08	-
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.04	0.04	-
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	0.02	0.02	-
<b>Extracto de malta</b>	-	-	3
<b>Agar</b>	2	2	2

### 8.3. Determinación de curva de crecimiento micelial en medio de cultivo sólido

Para evaluar la curva de crecimiento, en dos ensayos se calculó el área de crecimiento total de *P. djamor*, realizando diez repeticiones para cada medio. Se colocó en el centro de las cajas Petri micelio de *P. djamor* con la medida de 0.5 x 0.5 cm. Después se tomaron las mediciones de los radios de crecimiento, hasta que invadieron totalmente (figura 5).

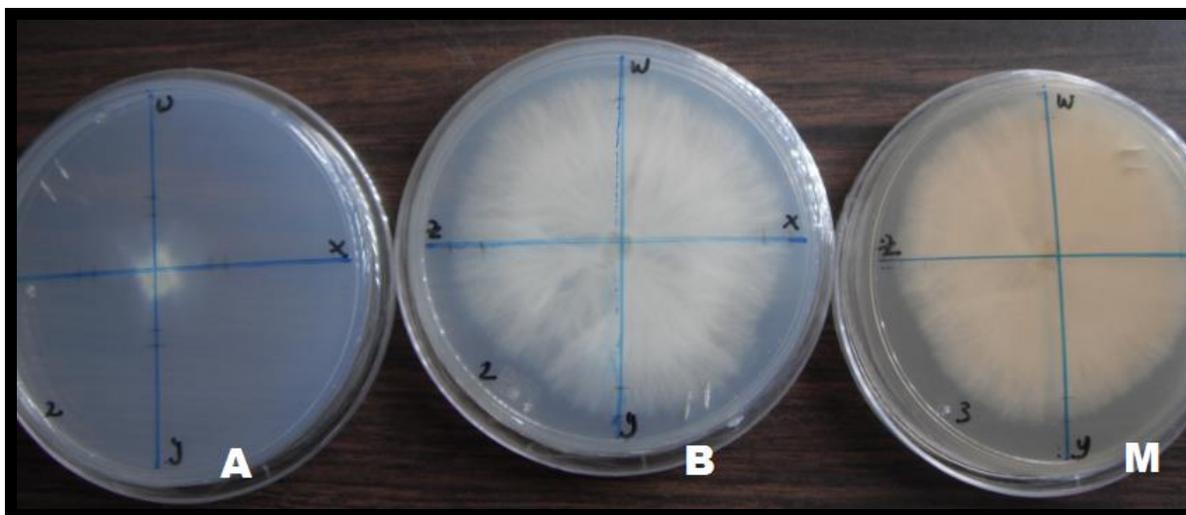


Figura 5. Medición de crecimiento micelial de *P. djamor* en medio de cultivo sólido con diferente composición nutricional, medio A, B y M. Con 8 días de incubación.

### 8.4. Determinación de biomasa de *P. djamor* en medio de cultivo líquido

Los tres medios de cultivo A, B y M (tabla 5) a excepción del agar, empleando 500 mL en cada frasco, con cuatro repeticiones para cada medio. Se agregaron diez cuadritos de 0.5 x 0.5 cm, con micelio de *P. djamor*, ya activado, y se dejó en incubación a 26 °C durante 28 días (figura 6). Posteriormente se filtró para tomar la lectura de peso fresco, y después se dejaron secar a 40 °C por dos días para obtener el peso total de biomasa seca.

### 8.5. Producción de carpóforos

#### 8.5.1. Inóculo de granos de trigo a partir de micelio de *P. djamor* crecido en medio sólido

La producción de “semilla” se realizó utilizando granos de trigo previamente lavados y remojados durante 24 h (figura 7). Una vez que el grano fue esterilizado y enfriado a temperatura ambiente se inoculó con micelio crecido en los medios sólidos A, B y M, se incubaron en una cámara oscura a 28 °C hasta que el micelio invadiera totalmente el

grano, con 10 repeticiones para cada medio. El mismo método fue empleado para la obtención de semilla secundaria y terciaria (Aguilar 2007).

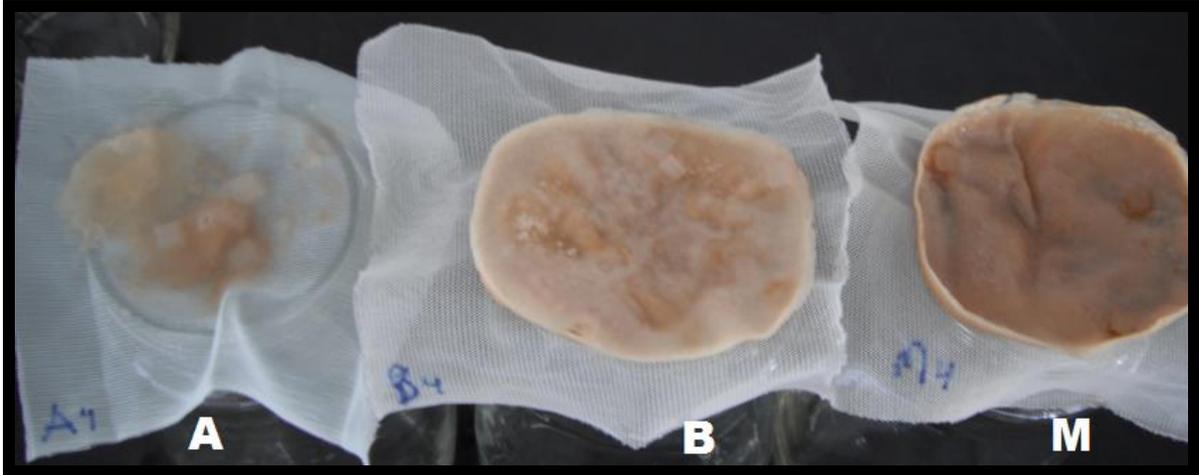


Figura 6. Producción de biomasa de *P. djamor* en diferentes medios de cultivo líquido, incubado a 26 °C durante 28 días.



Figura 7. Producción de inóculo- semilla de *P. djamor* en trigo.

### 8.5.2. Preparación del sustrato

Como sustrato se utilizó paja de trigo, que se hidrató durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente el sustrato se pasteurizó, durante 1 hora y treinta minutos. Se dejó enfriar y después se elaboraron bolsas con 500 g cada una (figuras 8 y 9) (Aguinaga 2012; Song 2005).



Figura 8. Pasteurización de paja de trigo.



Figura 9. Empaquetamiento de paja de trigo.

### 8.5.3. Obtención de cuerpos fructífero de *P. djamor*

El sustrato estéril y frío fue inoculado asépticamente con la “semilla” (aproximadamente 250 g “semilla”/500 g de sustrato húmedo), 10 repeticiones se realizaron para cada medio. Las bolsas de sustrato ya inoculadas se colocaron en una cámara oscura a 28 °C. Después de 7 días de la inoculación (figura 10), las bolsas se perforaron para permitir el intercambio gaseoso y posteriormente se colocaron en la misma cámara hasta que el micelio invadió completamente el sustrato. Durante ese periodo se llevaron a cabo revisiones visuales periódicamente para observar el desarrollo del micelio. Se registró el tiempo de invasión y de formación de primordios. Una vez que el sustrato fue invadido y la formación de primordios comenzó a evidenciarse, se retiraron de la cámara oscura y se colocaron en una cámara donde pudieron recibir luz indirecta en invernadero con el ciclo natural de los meses de junio, julio y agosto en la Ciudad de México, temperatura ambiente, ventilación, para inducir la formación de los esporóforos. Aproximadamente una semana después de la aparición de los primordios y antes de que ocurriera el proceso de esporulación, se cortaron los cuerpos fructíferos desde su base, se pesaron y midieron (Aguilar, 2007).

### 8.5.4. Parámetros de productividad

La precocidad se midió como el número de días transcurridos desde el inicio de la incubación en condiciones de fructificación hasta la primera cosecha de cuerpos fructíferos maduros en cada una de las bolsas (Larraya et al., 2003; Idareta *et al.*, 2004).

Una vez medidos los carpóforos, se clasificaron dependiendo del diámetro alcanzado por su pileo (Salmones *et al.*, 1997) dentro de cuatro grupos (tabla 6).



Figura 10. Incubación de la semilla de *P. djamor* en las bolsas con paja de trigo.

Tabla 6. Clasificación del tamaño de pileo alcanzado por los carpóforos.

<b>Grupo</b>	<b>Tamaño (cm)</b>
<b>G1</b>	< 5
<b>G2</b>	5 a 9.9
<b>G3</b>	10 a 14.9
<b>G4</b>	15 0 más



Figura 11. Cosecha de cuerpos fructíferos de *P. djamor*.

Una vez cosechados los cuerpos fructíferos de cada medio (figura 11), se pesaron en una balanza granataria, y se les determinó el peso promedio de cuerpos fructíferos cosechados (PMCF; Royse *et al.*, 2004). La eficiencia biológica (%EB) se calculó de acuerdo a Tschierpe y Hartmann (1997) como el peso de hongos frescos entre el peso seco del sustrato multiplicado por cien. La tasa de producción (Royse *et al.*, 2004) se calculó dividiendo %EB entre el tiempo total de cultivo desde el primer día de inoculación hasta el último día que fue la cosecha.

### 8.6. Obtención de extracto etanólico de micelio y cuerpo fructífero de *P. djamor*

Cada muestra de un gramo de micelio y cuerpo fructífero en peso seco crecido en medio sólido A, B y M, fueron molidos y posteriormente se extrajeron con 30 mL de etanol al 55%, durante 24 h con agitación, en baño maría a 45°C (Yamato). Cada muestra se sometió posteriormente a centrifugación con 6000 rpm / min durante 5 min. Se recogió el sobrenadante y el residuo se volvió a extraer con 30 mL de etanol durante 24 h (figura 12). El etanol se elimina por evaporación entre 50 y 60° C. Para obtener el peso seco del extracto de etanol, se toman los pesos de los tubos vacíos y peso de los tubos con extracto (Zeng *et al.*, 2012).



Figura 12. Elaboración de extractos etanólicos en *P. djamor*. Se realizó la extracción secuencial por 24 h (izquierda), seguida por otro periodo de 24 h (derecha).

### 8.7. Determinación del contenido de fenoles totales en *P. djamor*

Las extracciones de etanol fueron analizadas por su contenido fenólico total usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (figura 13). Para realizar la curva patrón se utilizó ácido gálico como solución estándar de 0.5 mg/mL a diferentes concentraciones 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25 mg/mL, y en muestras problema se utilizó el extracto etanólico del hongo de *P.*

*djamor* en 5 mg/mL y 1.5 mL de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 (0.2 N). Después de 10 min, se añadieron 2 mL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10% p/v) y la mezcla se incubó a 40 °C durante 30 min, posteriormente se homogenizó. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro a λ<sub>765nm</sub>. La concentración de compuestos fenólicos se reportó como equivalentes de ácido gálico (GAE; Zeng et al., 2012).



Figura 13. Evaluación de fenoles totales por la técnica de Folin-Ciocalteu.

#### 8.8. Determinación de la actividad antioxidante de *P. djamor* por el método 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).

Los extractos etanólicos fueron evaluados a diferentes concentraciones 450, 900, 1200 y 1500 ppm, utilizando una solución metanólica de DPPH con 250 ppm, se midieron espectrofotométricamente (Thermo Scientific Multiskan FC) a 517 nm. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, ya que corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración (figura 14; Villaño 2006).

Los valores de la absorbancia obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH, se utilizaron para determinar el % de captación de radicales libres (DPPH) mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ decoloración} = \% \text{ Inhibición} = \left( \frac{A - A_1}{A} \right) 100$$

A = Absorbancia del blanco

A<sub>1</sub> = Absorbancia de la muestra

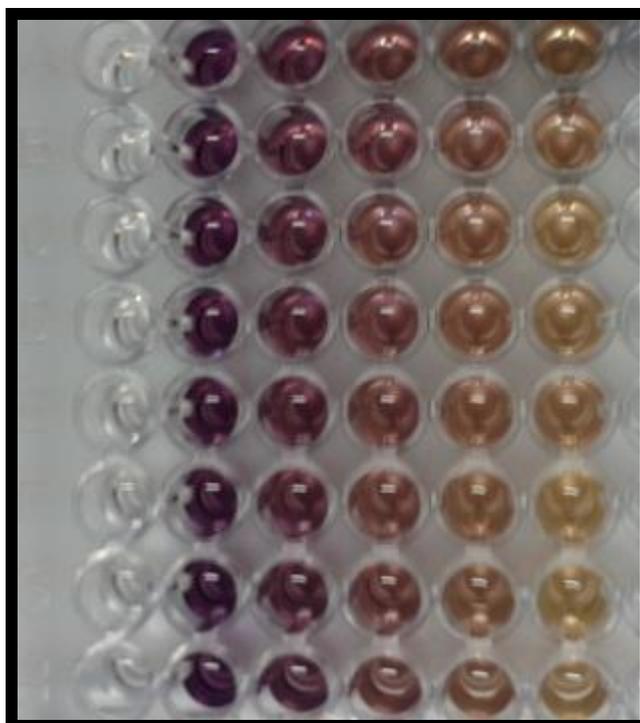


Figura 14. Decoloración del DPPH por el extracto etanólico de *P. djamor* a diferentes concentraciones.

### 8.9. Cálculo de $CE_{50}$

Considerando la ecuación de la recta que correlaciona la concentración del extracto con el porcentaje de decoloración de DPPH, se realizó la extrapolación para calcular la concentración necesaria para reducir el 50% de DPPH ( $CE_{50}$ ), definido como la cantidad de la muestra (ppm) necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia.

### 8.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la cobertura micelial, velocidad de crecimiento, producción de biomasa, precocidad, tamaño de píleos, peso de los cuerpos fructíferos, eficiencia biológica y tasa de producción, en micelio y cuerpo fructífero rendimiento de extracto etanólico, contenido fenólico y actividad antioxidante, fueron analizados por medio de un análisis de varianza de un factor, en el caso de que se encontraron diferencias significativas, fueron evaluadas con prueba de LSD ( $\alpha=0,05$ ) (Durán *et al.*, 2008). También se evaluaron las desviaciones estándar de cada medio.

Los resultados de la comparación del contenido fenólico, porcentaje de decoloración de DPPH y  $CE_{50}$  en micelio y cuerpo fructífero fueron evaluados mediante un análisis de varianza de dos factores y evaluando las diferencias significativas con sus medias por medio de la prueba de LSD ( $\alpha=0,05$ ) (Durán, 2008).

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Material biológico

La cepa CMITZ-13 quedó registrada en el herbario IZTA en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México con el número de registro 4594IZTA como *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boejin.

En la activación de la cepa de *P. djamor* se observó la morfología micelial con crecimiento de tipo filamentoso y buena abundancia. Por otra parte, el crecimiento micelial en los medios con diferente composición nutrimental, fueron de tipo filamentoso, el cambio se encontró en la abundancia, ya que en el medio A tuvo poca; en el B fue regular y en el medio M se presentó mayor (Figura 15).

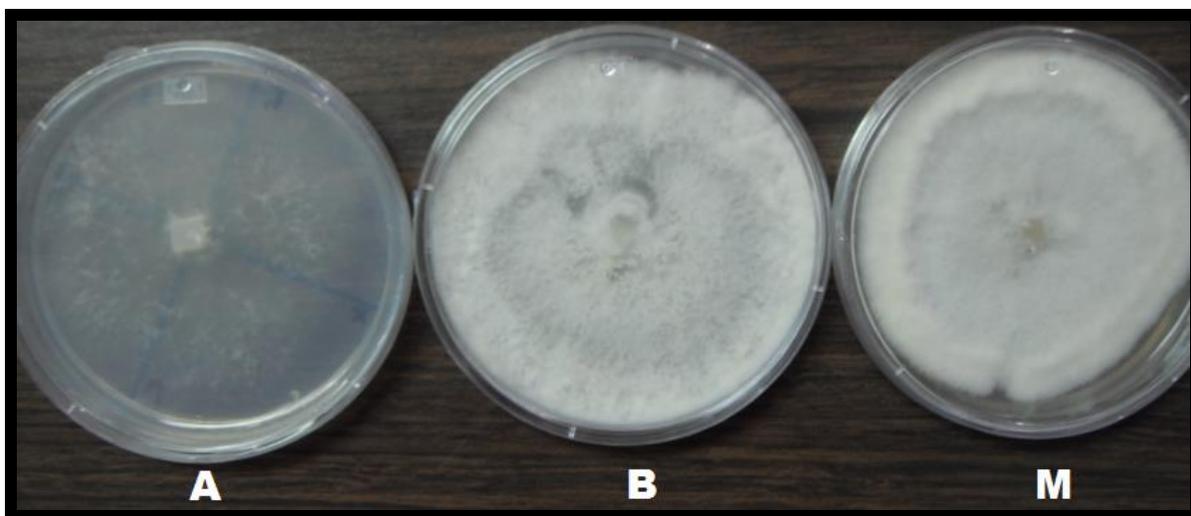


Figura 15. Desarrollo del micelio de la cepa de *P. djamor*, en tres medios de cultivo sólidos con diferente composición nutrimental y ocho días de incubación a 27 °C, de izquierda a derecha: Medio A, B y M.

### 9.2. Curva de crecimiento micelial de *P. djamor* en medio de cultivo sólido

En las cinéticas de crecimiento de *P. djamor* mostraron el mismo comportamiento (figuras 16 y 17), ya que el micelio cultivado en medio B fue el primero en tener el crecimiento máximo micelial, a los 8 días de incubación con un promedio de 38.02 cm<sup>2</sup> (primer ensayo) y a los 11 días de incubación 51.87 cm<sup>2</sup> (segundo ensayo), lo que representa una velocidad de 4.33 mm/día y 3.69 mm/día respectivamente, seguido del micelio crecido en medio M con 31.66 cm<sup>2</sup> a los 8 días y una velocidad de 3.96 mm/día y a los 11 días 44.39 cm<sup>2</sup> con una velocidad de 3.40 mm/día, y por último el menor crecimiento micelial se encontró en el medio A, en los 8 días de incubación tuvo 15.15 cm<sup>2</sup> con una velocidad de 2.72 mm/día y a los 11 días 29.2 cm<sup>2</sup> una velocidad de 2.76 mm/día (figuras 18 y 19).

Al aplicar el estadístico de ANOVA se obtienen diferencias significativas en el crecimiento (tabla 7 y 8), indicando que si hubo influencia en el crecimiento micelial debido a las diferentes concentraciones nutrimentales en los medios de cultivo sólidos.

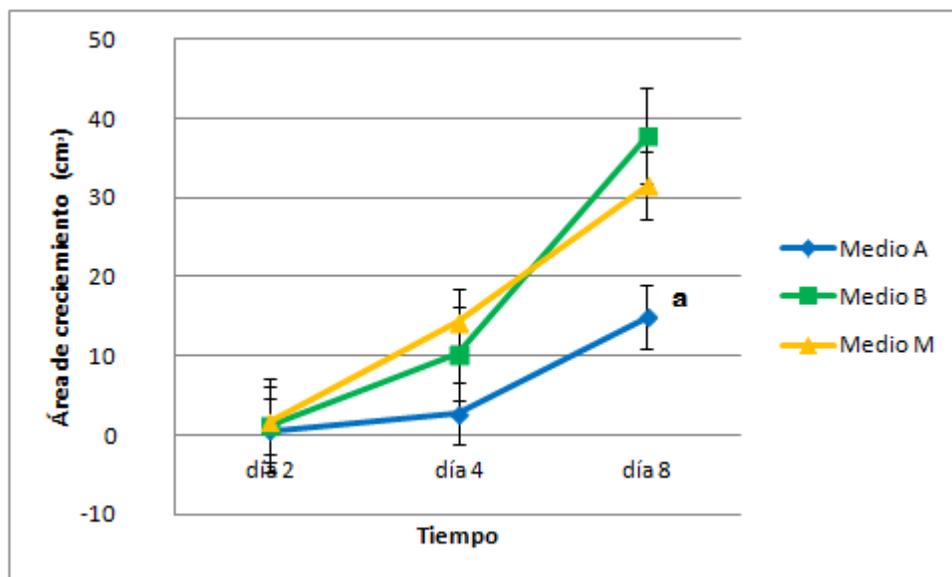
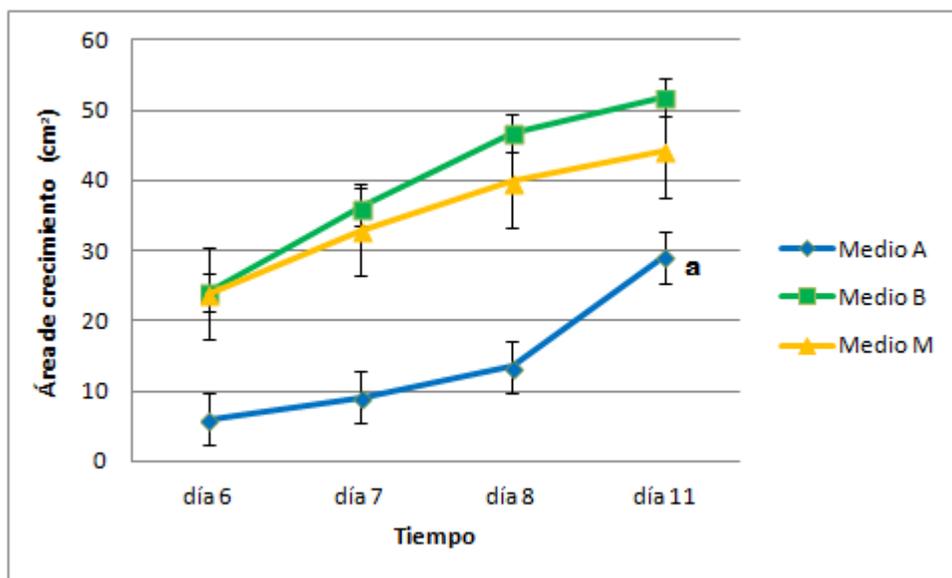


Figura 16. Primera comparación del crecimiento micelial de *P. djamor* en medio de cultivo sólido. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ) de 10 repeticiones. La letra a indica que el medio A tiene diferencia significativa con los medios B y M.



Figuras 17. Segunda comparación del crecimiento micelial de *P. djamor* en medio de cultivo sólido. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ) de 10 repeticiones. La letra a indica que el medio A tiene diferencia significativa con los medios B y M.

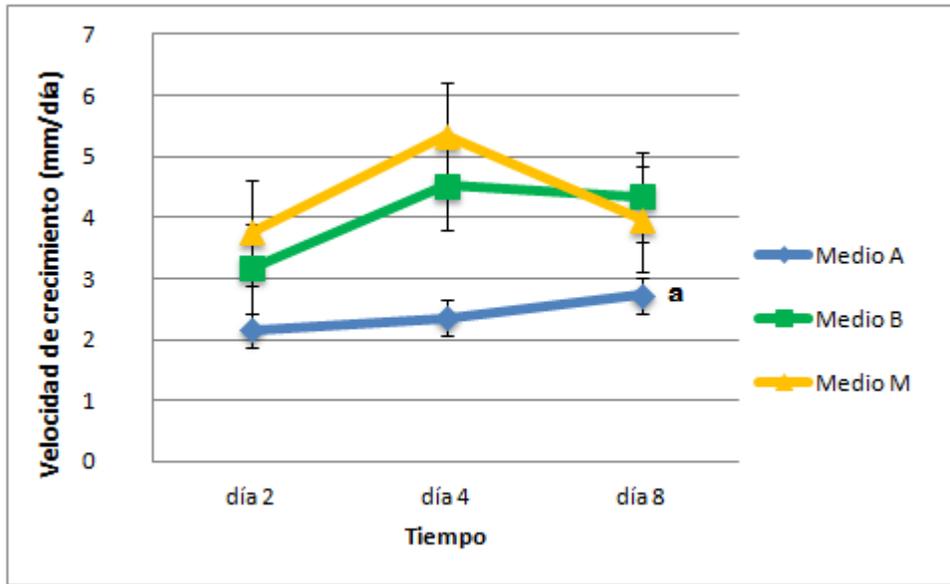


Figura 18. Velocidad de crecimiento de *P. djamor*, en diferentes medios de cultivo sólidos, con una composición nutrimental para cada medio, y 8 días de incubación a 27° C. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ) de 10 repeticiones. La letra a indica que el medio A tiene diferencia significativa con los medios B y M.

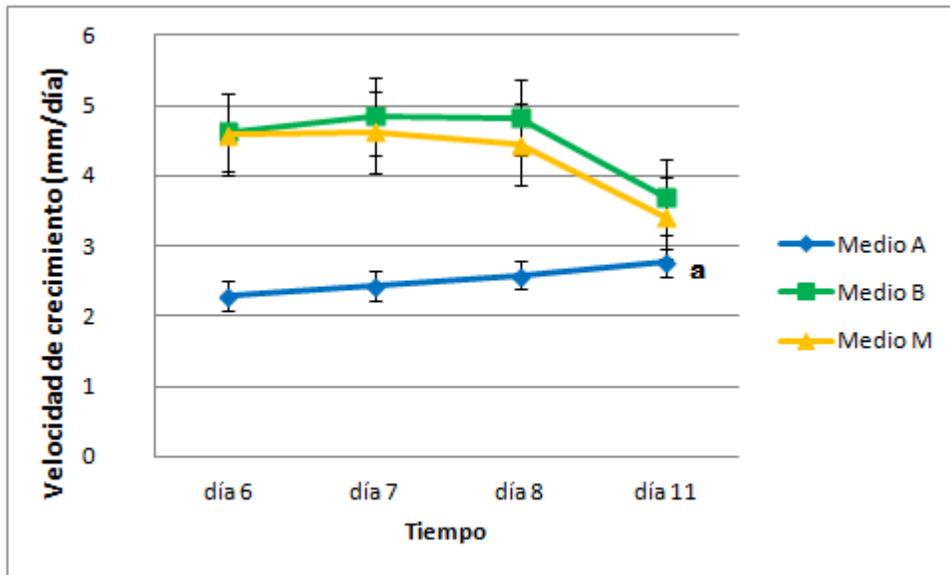


Figura 19. Velocidad de crecimiento de *P. djamor*, en diferentes medios de cultivo sólidos, con una composición nutrimental para cada medio, y 11 días de incubación a 27° C. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ) de 10 repeticiones. La letra a indica que el medio A tiene diferencia significativa con los medios B y M.

Tabla 7. Área de cobertura total de micelio de *P. djamor* cultivados en medio sólido.

	<b>Cobertura micelial a 8 días (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Cobertura micelial a 11 días (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>Medio "A"</b>	15.15 ± 3.93 a	29.2 ± 3.67 a
<b>Medio "B"</b>	38.02 ± 5.96	51.87 ± 2.70
<b>Medio "M"</b>	31.66 ± 4.26	44.39 ± 6.51

Se hicieron dos ensayos con diez repeticiones cada uno, la primera al día 8 y la segunda al día 11 de incubación. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ) de 10 repeticiones. La letra a indica que el medio A tiene diferencia significativa con los medios B y M.

Tabla 8. Velocidad de crecimiento del micelio de *P. djamor* en medio de cultivo sólido con diferente composición nutricional.

	<b>Velocidad de crecimiento a los 8 días de incubación (mm/día)</b>	<b>Velocidad de crecimiento a los 11 días de incubación (mm/día)</b>
<b>Medio "A"</b>	2.72 ± 0.35 a	2.76 ± 0.17 a
<b>Medio "B"</b>	4.33 ± 0.32	3.69 ± 0.09
<b>Medio "M"</b>	3.96 ± 0.26	3.40 ± 0.24

Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ) de 10 determinaciones. La letra a indica que el medio A tiene diferencia significativa con los medios B y M.

A lo largo del tiempo se observó un comportamiento lineal en el caso de los dos ensayos. Tomando en cuenta lo reportado previamente por Sánchez y Royse 2001, quienes indican que este tipo de crecimiento es característico del micelio cultivado en medio sólido. Como se puede observar en las figuras 16, 17, 18, 19 y en la tabla 8, la cepa de *P. djamor* cultivada en medio sólido B presentó mayor rapidez en el crecimiento de micelio y alcanzó un mayor tamaño en los tiempos de cultivo estudiados. Así mismo, en los dos ensayos de la curva de crecimiento (figuras 16 y 17), fue el primero en cubrir el diámetro total de la caja Petri entre los 8 y 11 días, este comportamiento es similar a lo ya reportado para la cepa *P. djamor* (Salmones *et al.*, 1997; Salmones *et al.*, 2004), donde obtuvieron un cubrimiento total de la caja Petri, entre los 10 y 16 días. Sin embargo los resultados en la

estimación de la velocidad media de crecimiento micelial, presenta variabilidad con dichos trabajos reportados, ya que son ligeramente más altos para Salmones et al., (2004) presentan valores de crecimiento promedio de 44.2 hasta 71.8 mm (5.8 mm/día) para las cepas *P. djamor* var. *roseus* en 10 días de incubación. En Salmones et al., (1997) la velocidad de crecimiento promedio para *P. djamor* fue de 8 mm/día. Cabe mencionar que estas variaciones pueden asociarse a la diferencia nutricional entre los medios de cultivo sólidos, ya que en el presente trabajo el medio M está compuesto sólo por extracto de malta y para los trabajos citados el medio convencional de extracto de malta (EMA) contiene peptona de harina de soya; también es importante mencionar que cada cepa tiene diferente lugar de origen, por tanto, aunque sean de la misma especie pueden metabolizar los nutrientes de diferente forma. Probablemente el crecimiento diferencial que se obtuvo en cada cepa está relacionada con el metabolismo de la misma, así como la diferente composición nutricional del medio de cultivo puede tener un efecto sobre la elongación y ramificación de la hifa y la rapidez con la que invade, por lo que es probable que las características de crecimiento y formación de biomasa sean resultado del metabolismo de la cepa (Aguilar 2007).

### **9.3. Producción de biomasa de *P. djamor* en medio de cultivo líquido**

Para comparar el incremento de biomasa de la cepa de *P. djamor* se utilizó medio de cultivo líquido con diferente composición nutricional durante 28 días. El micelio desarrollado en él, se muestra en la figura 21, el crecimiento micelial también fue de tipo filamentoso en los tres medios de cultivo, tuvo mayor producción de biomasa el medio B con 13.44 g de micelio fresco, seguido por el medio M con 11.36 g, y por último el medio A con 5.39 g. Sin embargo, cuando se considera el peso seco del micelio, el medio M fue quien produjo mayor cantidad con 0.8 g, seguido por el medio B con 0.61g, y por último el medio A con 0.076 g (figuras 20 y 21). Con los resultados del análisis estadístico ANOVA, se confirma que existen diferencias significativas, como se muestra en la tabla 9, obteniendo una mayor producción en los medios B y M, y se reafirma con prueba LSD y rango de error ( $\alpha=0,05$ ).

Tabla 9. Biomasa en peso fresco y seco (g), con 28 días de incubación, en medio líquido.

	Biomasa en peso fresco (g)	Biomasa en peso seco(g)	Contenido de agua (%)
<b>Medio "A"</b>	5.39 ± 0.58 a	0.076 ± 0.006 a	98.7
<b>Medio "B"</b>	13.43 ± 0.67 b	0.61 ± 0.010 b	95.5
<b>Medio "M"</b>	11.36 ± 1.03 c	0.80 ± 0.081 c	93

Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ) de 10 determinaciones. Letras diferentes indican que presentaron diferencias significativas entre cada medio.

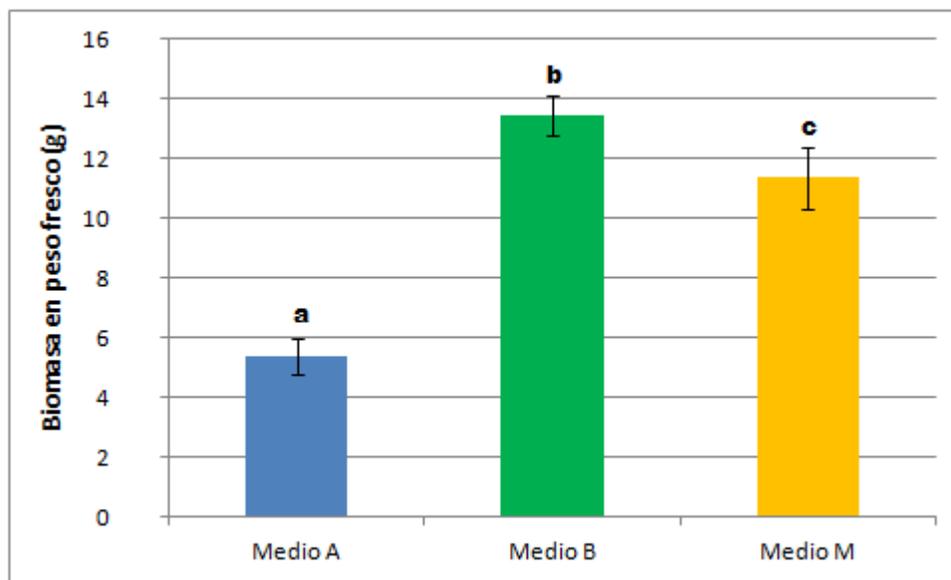


Figura 20. Peso húmedo de la biomasa de micelio de *P. djamor*, después de 28 días de cultivo en medio líquido. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ), de 10 repeticiones. Letras diferentes indican que presentaron diferencias significativas entre cada medio.

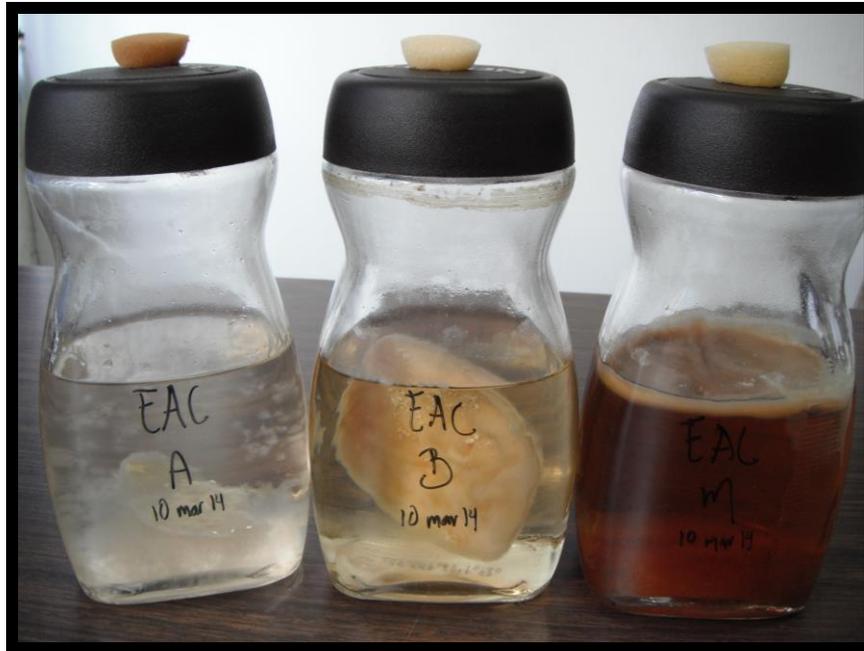


Figura 21. Comparación de la producción de biomasa micelial de *P. djamor* en medio líquido con diferente composición nutricional.

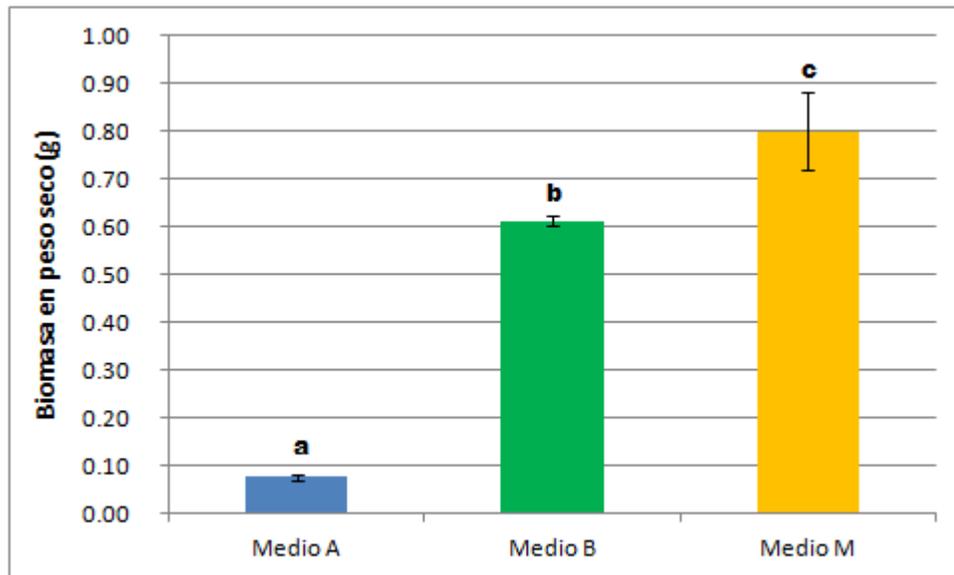


Figura 22. Biomasa en peso seco del micelio de *P. djamor*. Después de 28 días de cultivo en medio líquido. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ), de 10 repeticiones. Letras diferentes indican que presentaron diferencias significativas entre cada medio.

El tipo de crecimiento algodonoso o filamentoso, y su abundancia exuberante o regular indica cualitativamente la producción de biomasa de la cepa, sin embargo, para

determinar cuantitativamente se determina el peso seco del micelio. Como ya se mencionó, se obtuvo la mayor cantidad de biomasa seca en el medio de cultivo líquido M; esto se puede deber a que entre los tres medios de cultivo en el presente trabajo, es el medio que contiene mayor cantidad de carbohidratos. Debido a que en base seca, el extracto de malta contiene aproximadamente 90-92 % de carbohidratos y está compuesto de hexosas (glucosa y fructosa), disacáridos (maltosa, sacarosa), trisacáridos (maltotriosa) y dextrinas (polímeros de glucosa  $\alpha$  1, 4 con ramificaciones  $\alpha$  1, 6), y las sustancias nitrogenadas presentes en el extracto de malta incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas (Aguilar 2007). Dichos compuestos favorecieron la producción de biomasa, ya que los carbohidratos son la fuente directa de energía para su metabolismo y necesario para la formación de diferentes partes y estructuras celulares, Así como aumenta el crecimiento micelial en relación a los carbonos presentes en los ácidos grasos (Sánchez *et al.*, 2001).

#### 9.4. Obtención de inóculo-grano “semilla”

En la obtención de inóculo-semilla en grano de trigo de *P. djamor* se observó que sí hubo diferencias cualitativas en la morfología de la cepa. Entre 15 a 20 días de incubación, siendo el micelio crecido en medio M el que tuvo con mayor abundancia. Sin embargo, el micelio del B invadió con mayor rapidez el sustrato de trigo. Los mismos resultados se registraron en las tres fases de obtención de semilla: primaria, secundaria y terciaria; así como buena adaptabilidad del micelio al sustrato, lo que indica condiciones apropiadas para la propagación del hongo (100% luego de aproximadamente 20 días).



Figura 23. Invasión de grano de trigo con micelio de *P. djamor* cultivado en medio A. Con 5 días de incubación.



Figura 24. Invasión de grano de trigo con micelio de *P. djamor* cultivado en medio B. Con 5 días de incubación.



Figura 25. Invasión de grano de trigo con micelio de *P. djamor* cultivado en medio M. Con 5 días de incubación.

En la obtención de inóculo-semilla en grano de trigo de *P. djamor* se observó buena adaptabilidad del micelio en el grano de trigo así como crecimiento rápido, esto coincide con lo hallado en trigo (Aguilar 2007; Bermúdez *et al.*, 2007), sorgo (López *et al.*, 2005) y

cebada (Ríos *et al.*, 2010), ya que en todos ellos se obtuvo una propagación eficiente (figuras 23, 24 y 25).

## **9.5. Fructificación y cosecha**

En la etapa de fructificación el micelio de *P. djamor* que fue inoculado en sustrato de paja de trigo que contiene entre 28-42% de celulosa, 23-38% de hemicelulosa y de 12-21% de lignina, cualitativamente mostró buena invasión en todos los medios. Los primeros primordios se presentaron entre los 19 y 21 días de incubación. Por tanto, los parámetros de productividad se muestran a continuación.

El principal grupo de materias primas de base o de volumen utilizados en la elaboración de sustratos lo forman las pajas de cereales, y son materias con un alto predominio de lignocelulosa y con un contenido en nitrógeno por debajo 1%, respetando la relación C/N (Sánchez *et al.*, 2002). Sin embargo, altas concentraciones de C/N favorecen el crecimiento micelial y bajas relaciones favorecen el desarrollo de cuerpos fructíferos (Garzón *et al.* 2008). Los primeros primordios se presentaron entre los 19 y 21 días de incubación, coincidiendo con lo ya reportado para dicha especie por Salomones *et al.*, (1997 y 2004).

## **9.6. Parámetros de productividad**

### **9.6.1. Precocidad (Pr).**

La Precocidad (Pr) se midió como el número de días transcurridos desde el inicio de la incubación en condiciones de fructificación, hasta la primera cosecha de cuerpos fructíferos maduros en cada una de las bolsas. En la figura 26 se muestra que el tiempo de obtención de la primera cosecha de cuerpos fructíferos de la cepa de *P. djamor*, fue similar cuando la semilla inoculada provenía de cualquiera de los medios de cultivo, 26.8 días para la proveniente del medio A, 27.6 días para la proveniente del medio B y 27.8 días en el caso del medio M ( $P \geq 0.5$ ), por lo que la utilización de “semilla” inoculada con micelio crecido en medios con diferente composición nutrimental no afectó la precocidad de la cepa utilizada para la fructificación.

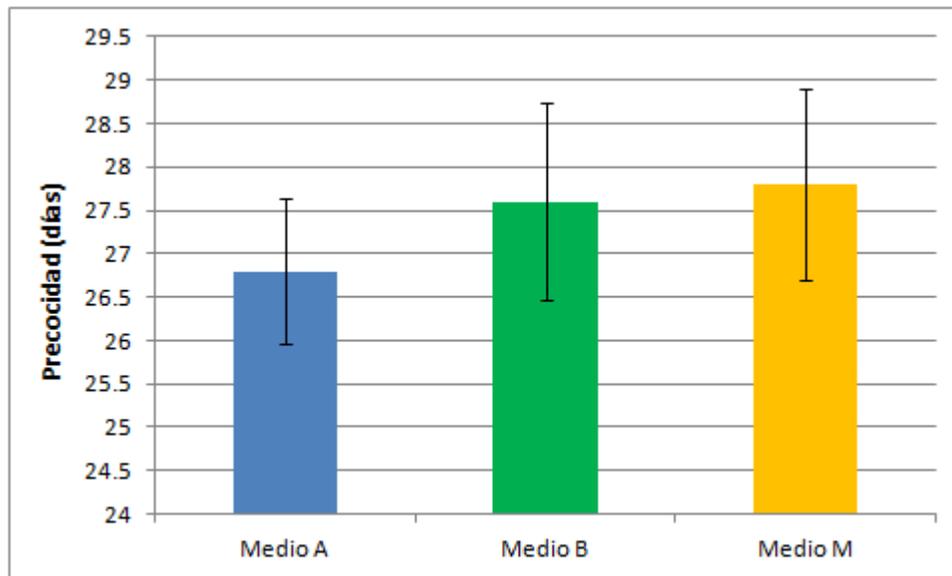


Figura 26. Precocidad (Pr) de la cepa de *P. djamor*. No se encontraron diferencias significativas. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

La precocidad presentada por *P. djamor* en el presente trabajo fue en promedio de 27 días, esto es inferior a lo reportado por Salmenes et al., (1997 y 2004) ya que para esta cepa fue de 19 días en su primera cosecha, favoreciendo la disminución del tiempo de producción. Cabe mencionar que puede variar entre cada especie de *Pleurotus*, ya que el metabolismo del hongo y el sustrato pueden ser diferentes. En ambos trabajos utilizaron para la fructificación el inóculo con semilla de sorgo y como sustrato paja de cebada, en cuanto a las condiciones ambientales fueron muy similares y controladas. Hacen mención que los parámetros de productividad pueden modificarse debido a las diferencias en la composición nutrimental del sustrato y también a los factores genéticos.

### 9.6.2. Clasificación de los carpóforos

En la figura 27 se muestran las imágenes de los cuerpos fructíferos obtenidos de *P. djamor*, y se puede observar que la morfología y la coloración son iguales, independientemente del medio de cultivo de que provenía la semilla. Con respecto al diámetro de los carpóforos se formó sólo un grupo y corresponde a G1 que incluye carpóforos menores de 5 cm.

En la Figura 28 se observa que no se encontraron diferencias significativas entre el tamaño de los píleos con respecto al medio de cultivo empleado para obtener la semilla; encontrando que los cuerpos fructíferos que fueron inoculados con micelio cultivado en el medio A un diámetro de 5.13 cm, seguidos por los carpóforos que fueron inoculados con

micelio cultivado en el medio M con un promedio de 4.76 cm, y por último, los basidiocarpos del medio B con un promedio de 4.73 cm. Lo que sustenta que la utilización de diferente composición nutricional para el cultivo de micelio vegetativo no afecta en el tamaño de los basidiocarpos.



Figura 27. Basidiocarpos de la cepa *P. djamor*, obtenidos de micelio crecido con diferente composición nutricional.

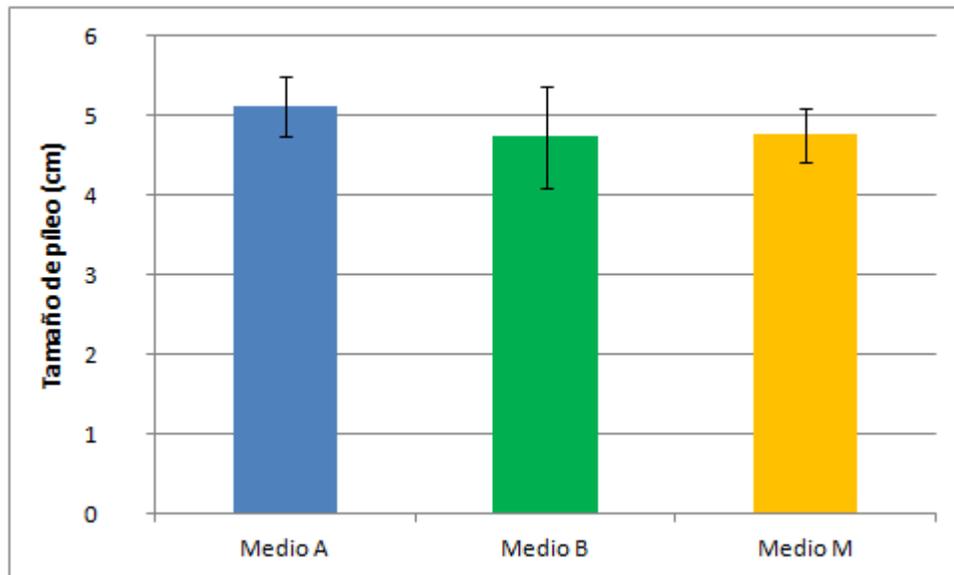


Figura 28. Mediciones promedio de los píleos de cuerpos fructíferos de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). No se encontraron diferencias significativas.

### 9.6.3. Peso de los cuerpos fructíferos cosechados

El peso promedio de los cuerpos fructíferos cosechados (PMCF) se calculó en base al total de basidiocarpos colectados en las tres cosechas por cada medio, siendo el M el que obtuvo mayor peso con un promedio de 6.11 g, seguido por el B con 5.88 g, y con menor peso el A con 5.19 g. Al ser analizados estadísticamente con ANOVA de un factor, no tuvo diferencias significativas (figura 29), ya que las medias fueron muy similares, significa que el micelio proveniente de medio sólido con diferente composición nutrimental e inoculado como semilla en la paja de trigo como sustrato, para la producción de cuerpos fructíferos no afectó el peso de los basidiocarpos. El PMCF de *P. djamor* no ha sido reportado.

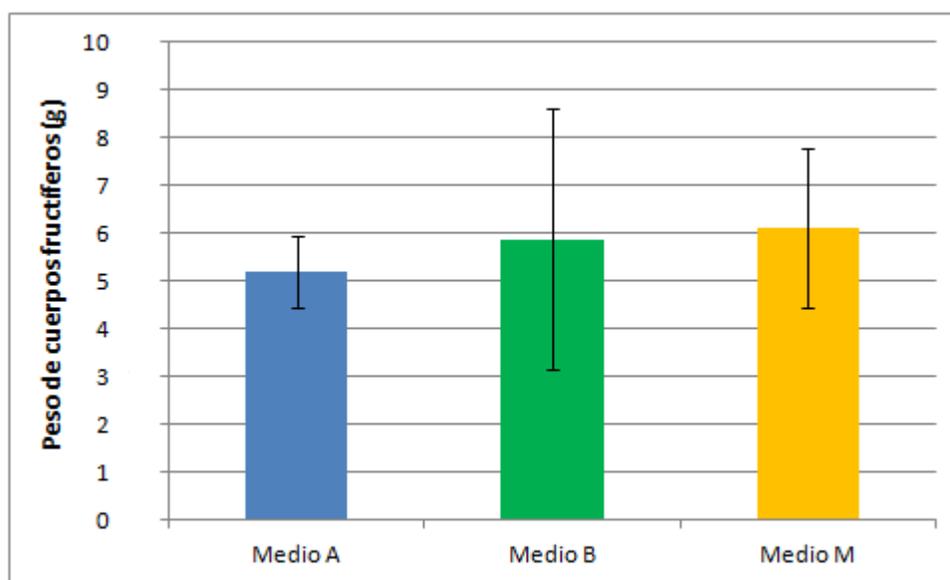


Figura 29. Peso promedio de cuerpos fructíferos cosechados de la cepa *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). No se encontraron diferencias significativas.

### 9.6.4. Eficiencia Biológica (%EB)

La mayor eficiencia biológica (%EB) se presentó en el sustrato inoculado con “semilla” obtenida de micelio crecido en medio sólido M (268.75%), seguida por el medio B (252.08%), y con menor productividad el A (221.25%) (figura 30), obteniendo diferencias significativas al aplicar ANOVA de un factor. La cantidad de cuerpos fructíferos formados sí se ven afectados por la composición nutrimental del medio sólido utilizado para producir el inóculo de micelio (tabla 10). Además, lo que pudo haber influido en la diferencia entre la producción de cuerpos fructíferos provenientes de micelio crecido en medio de cultivo A

y B, es la ausencia de extracto de levadura en el medio A, ya que ayuda al crecimiento de los hongos.

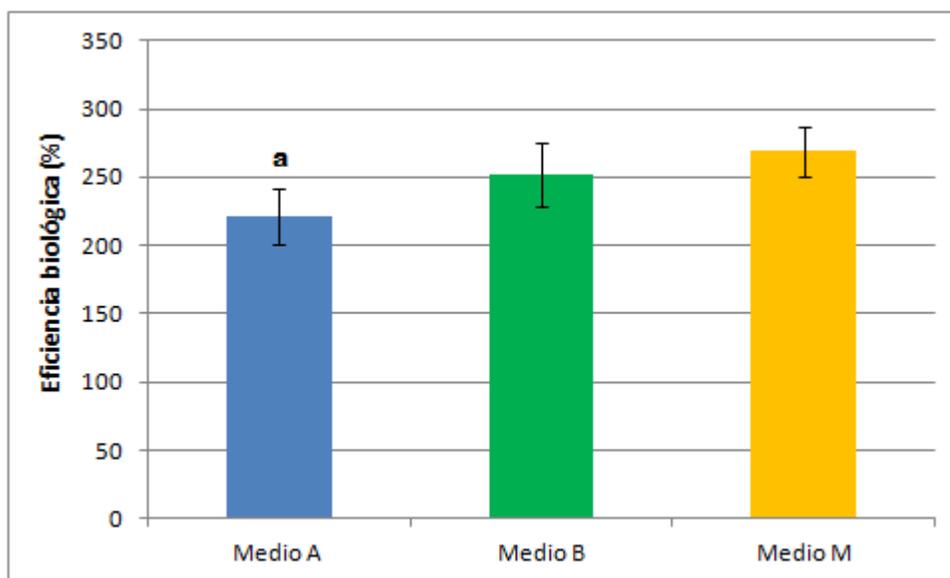


Figura 30. Eficiencia biológica (%EB) presentada por la cepa de *P. djamor* proveniente de micelio crecido en diferentes medio de cultivo sólido con diferente composición nutricional. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio A muestra diferencia significativa del medio M.

Tabla 10. Promedio de porcentaje de la eficiencia biológica (%EB) y tasa de producción (TP) de *P. djamor*.

	<b>Eficiencia Biológica (%)</b>	<b>Tasa de producción (%)</b>
<b>Medio "A"</b>	221.25 ± 21.01 a	4.65 ± 0.36
<b>Medio "B"</b>	252.08 ± 23.61	4.79 ± 0.55
<b>Medio "M"</b>	268.75 ± 18.22	5.70 ± 0.60 a

Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que tiene diferencias significativas con los otros medios.

### 9.6.5. Tasa de producción (TP)

En la figura 31 se presenta la TP de basidiocarpos obtenidos por la cepa de *P. djamor*, la mayor fue del medio M (5.70%), seguido del B (4.79) y con menor el A (4.65). Al evaluar estadísticamente los resultados con un análisis de varianza de un factor, si presentaron diferencias significativas cuando se inoculó el sustrato con "semilla" obtenida a partir de

micelio crecido en medios de cultivo con diferente riqueza nutricional, por lo que la utilización de diferentes medios sólidos si influyó en la TP (tabla 10). Los cuerpos fructíferos provenientes de semilla con micelio crecido en medio de cultivo sólido A y B fueron quienes no tienen diferencias significativas.

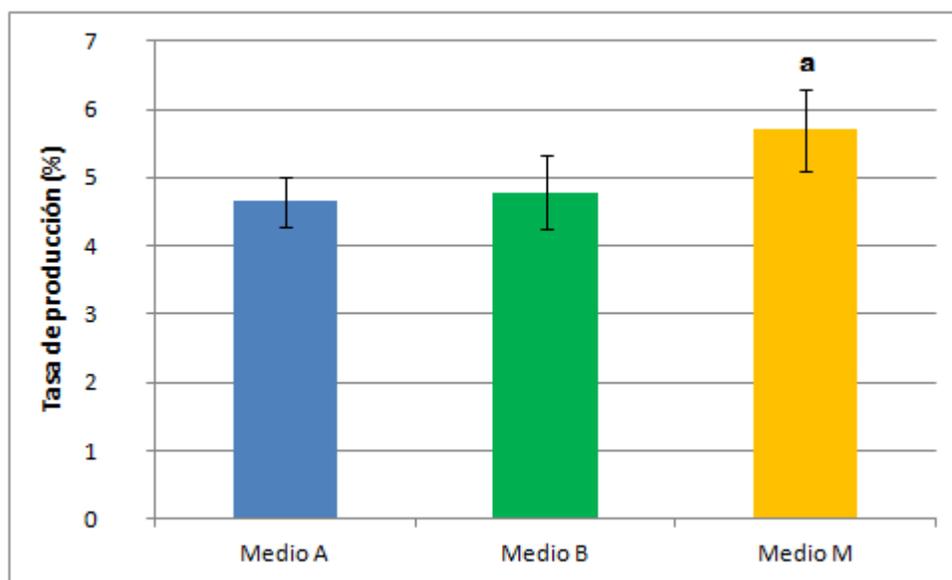


Figura 31. Tasa de producción presentada por la cepa de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que tiene diferencias significativas con los otros medios.

La EB y TP reportadas en el presente trabajo para *P. djamor* en la producción de cuerpos fructíferos provenientes de micelio crecido en los tres medios sólidos con diferente composición nutricional fueron superiores a las obtenidas por otros autores para la misma especie. Por ejemplo, Salmones *et al.*, (2004) obtuvieron en *P. djamor var. djamor* y *P. djamor var. roseus* eficiencias biológicas de 70%, con una tasa de producción de 1.16%. Mientras que en Salmones *et al.*, (1997) trabajaron con tres cepas y para *P. djamor* tuvieron eficiencia biológica de 45.4%, en *P. ostreatus* 44.3% y por último *P. pulmonarius* con 51.2%, respectivamente las tasas de producción fueron de 1.01%, 0.93% y 0.80%. Por otra parte, Bernabé *et al.*, (2004) trabajaron con diferentes sustratos agrícolas para la producción de *P. pulmonarius* y el sustrato con mayor EB fue la mezcla de rastrojo de jícama con rastrojo de maíz (1:1 y 2:1) con 153.69 y 163.79% con una TP de 3.41 y 3.5%. Sin embargo, en el trabajo de Bermúdez *et al.*, (2007), con *P. ostreatus* y *P. sajor caju* sembrados sobre pulpa de café, obtuvieron EB más altas con 225.2 y 204.4% y una TP de 4.50 y 3.41%, en comparación con otras mezclas de sustratos. De tal

modo que los datos de EB y TP en el presente trabajo están dentro de los valores reportados por Bermúdez *et al.*, (2007), así como el período de producción de 50 y 60 días, respectivamente.

Los bajos índices de EB se atribuyen al agotamiento de los nutrientes en el sustrato y la forma en que cada semilla los asimiló, así como también a la procedencia de ésta, factores que influyen directamente sobre la producción de carpóforos (Ríos *et al.*, 2010), de tal manera que, la cepa de *P. djamor* utilizada en el presente trabajo mostró buena asimilación de los nutrientes obtenidos en el medio de cultivo sólido, así como de la semilla de trigo y el sustrato de paja de trigo, sin embargo los cuerpos fructíferos provenientes de micelio crecido en el medio de cultivo sólido M, fueron quienes mostraron mejor asimilación de los nutrientes en el periodo de producción. Sin embargo, lo que pudo haber influido en la generación de cuerpos fructíferos provenientes del micelio crecido en medio de cultivo A y B, es la ausencia de extracto de levadura en el medio A, ya que dicho extracto es fuente de vitaminas para el crecimiento del hongo (Pascual *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 20011). Tomando en cuenta que los tres porcentajes promedios de la EB y la TP obtenidos de la producción de *P. djamor* del presente trabajo se puede decir que obtuvieron una buena producción en general.

## **9.7. Contenido fenólico total**

### **9.7.1 Rendimiento de extracto etanólico de micelio de *P. djamor***

La determinación de fenoles totales en *P. djamor* fue llevada a cabo en el extracto etanólico de micelio, crecido en medio de cultivo líquido con diferente riqueza nutrimental y con tejido de los cuerpos fructíferos, por otra parte, con la finalidad de recuperar mayor contenido fenólico se realizaron 2 extracciones secuenciales de 24 h cada una. De tal forma que el mayor rendimiento de los extractos etanólicos secos como se puede observar en la figura 32 lo obtuvo el micelio crecido en el medio M, con  $43.05\% \pm 4.55$ , seguido el medio B con  $26.90\% \pm 2.36$  y por último del A con  $20.23\% \pm 5.91$ . Se aplicó la prueba de ANOVA para determinar si hay diferencias significativas entre las medias (Tabla 11). Esto quiere decir que la riqueza nutrimental si influye en el rendimiento del extracto etanólico, y se reafirma con prueba LSD y rango de error ( $\alpha=0,05$ ). Lo cual indica que el extracto de malta utilizado en la formulación del medio de cultivo M, influye significativamente en el rendimiento hidro-alcohólico. Hasta el momento no encontramos antecedentes reportados sobre el rendimiento de algún extracto de micelio para el género *Pleurotus*.

Tabla 11. Rendimiento de extracto etanólico de micelio de *P. djamor*.

Medios de cultivo	Rendimiento del extracto etanólico (%)
Medio A	20.23% ± 5.91
Medio B	26.90% ± 2.36
Medio M	43.05% ± 4.55 a

Se realizaron 2 extracciones secuenciales de 24 h cada una. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio M presentó diferencias significativas con respecto a los otros medios.

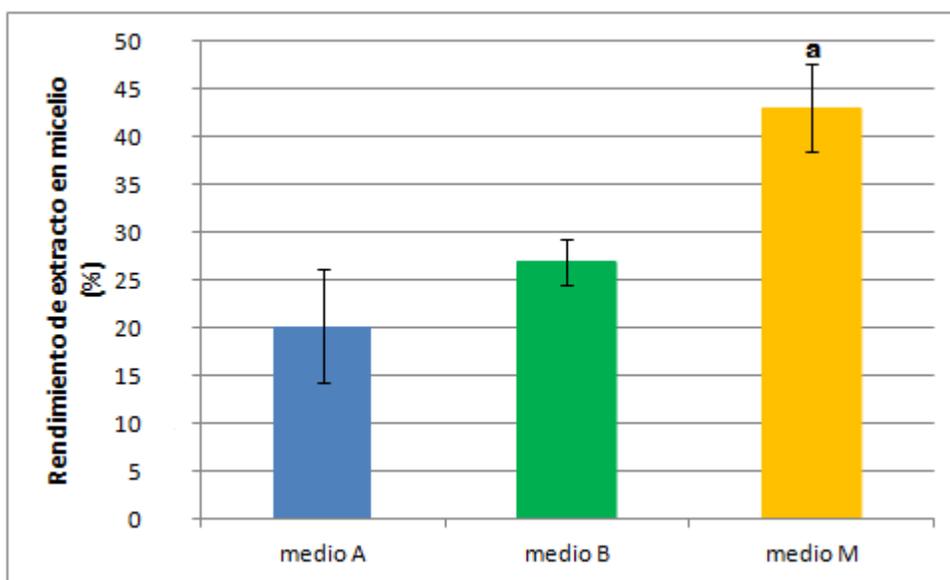


Figura 32. Rendimiento del extracto etanólico de micelio seco de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio M presentó diferencias significativas con respecto a los otros medios.

Beltrán et al., 2013 determinaron el contenido de fenoles totales de *Pleurotus* en extractos con solventes de diferente polaridad y mencionan lo importante que son las propiedades químicas moleculares de un solvente y no solo para incrementar la selectividad de los componentes extraídos, sino también para mejorar el rendimiento de la extracción. Por ejemplo el agua y el etanol son solventes polares en los que son solubles diferentes solutos polares e iónicos, como los polifenoles, proteínas y sales minerales. Por otra parte, solventes no polares como el n-hexano solo disuelven compuestos apolares, como los lípidos. Los solventes dipolares como la acetona y el acetato de etilo, en cambio,

tienen una polaridad relativamente intermedia y solubilizan a solutos con una polaridad relativa similar (Beltrán *et al.*, 2013).

### 9.7.2. Contenido de fenoles totales en micelio de *P. djamor*

En cuanto al contenido de fenoles totales por gramo del extracto de micelio, como podemos observar en la figura 33, el micelio crecido en medio M fue el que tuvo mayor concentración de fenoles totales con  $18.45 \pm 1.53$  mg, seguido del Medio A con  $12.36 \pm 0.66$  mg, y por último el micelio seco en medio B con  $10.99 \pm 1.13$  mg. Para el contenido de fenoles totales por gramo de micelio seco, también el medio M fue quien obtuvo mayor concentración de polifenoles con  $7.91 \pm 0.65$  mg (figura 34). Se analizaron estadísticamente los resultados con ANOVA y mostró que si existen diferencias significativas entre la concentración de polifenoles por cada medio nutritivo, esto quiere decir que si afecta la composición nutrimental en el contenido fenólico por 1g de extracto y 1g de micelio seco (tabla 12). Dichos estadísticos se comprobaron con prueba LSD y rango de error ( $\alpha=0,05$ ).

Tabla 12. Fenoles totales en micelio seco de *P. djamor*.

Medios de cultivo	Contenido fenólico mgGAE/g extracto	Contenido fenólico mgGAE/g de micelio seco
<b>Medio A</b>	$12.36 \pm 0.66$	$2.51 \pm 0.75$
<b>Medio B</b>	$10.99 \pm 1.13$	$2.94 \pm 0.06$
<b>Medio M</b>	$18.45 \pm 1.53$ a	$7.91 \pm 0.65$ a

Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio M presentó diferencias significativas con respecto a los otros medios.

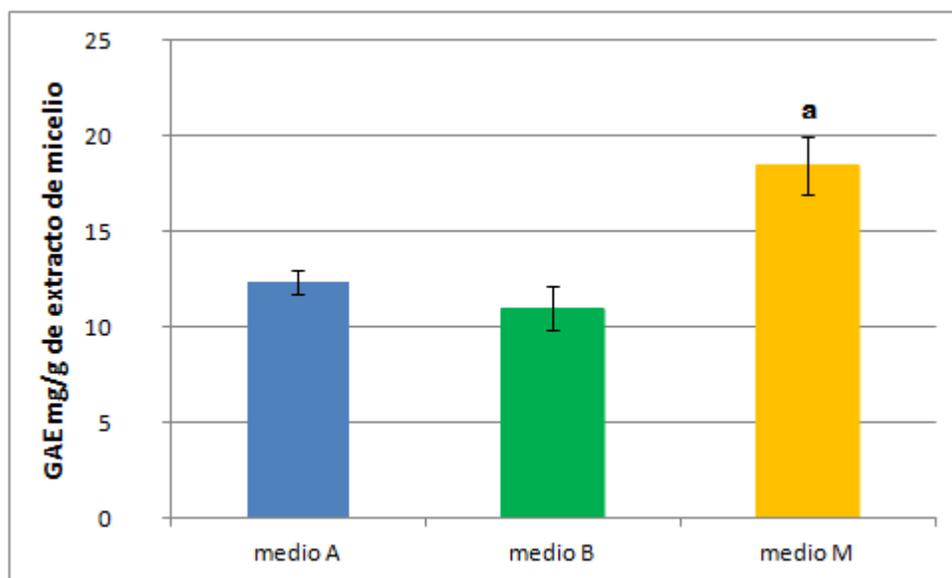


Figura 33. Concentración de fenoles totales en el extracto etanólico de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio M presentó diferencias significativas con respecto a los otros medios.

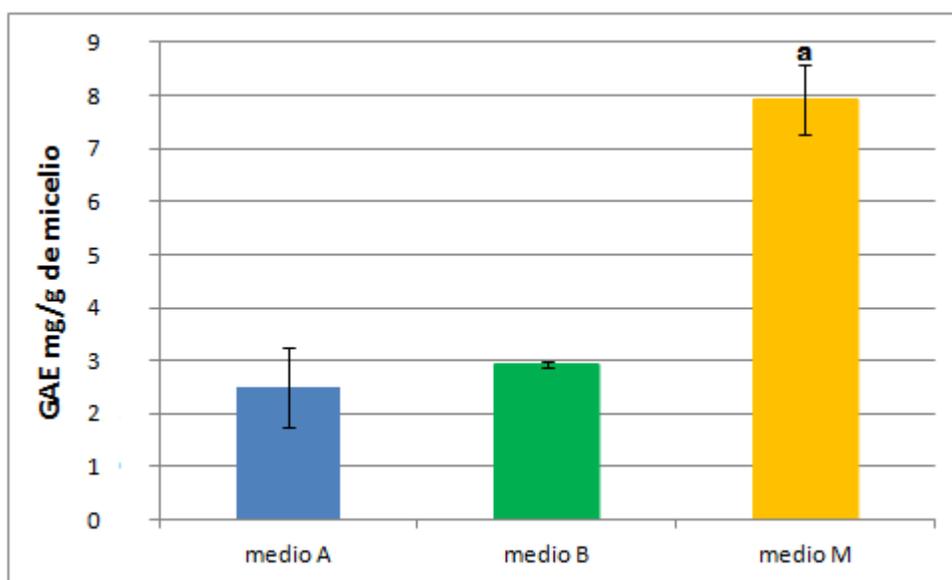


Figura 34. Concentración de fenoles totales en el micelio seco de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio M presentó diferencias significativas con respecto a los otros medios.

Por tanto, el contenido de fenoles por gramo de extracto o micelio seco en el medio A y B no son estadísticamente diferentes, esto quiere decir que si tuvo influencia la composición nutrimental en el medio M el cual está compuesto de extracto de malta, sobre la concentración de fenoles en el extracto y micelio de *P. djamor*. Cabe mencionar que hasta

el momento no se han reportado trabajos de investigación sobre el contenido total de fenoles en micelio de *P. djamor*.

De acuerdo al análisis estadístico el contenido de fenoles totales por gramo de extracto o micelio seco, en el medio M influyó la composición nutrimental, el cual está compuesto de extracto de malta. Se ha reportado que para una eficiente producción de biomasa y de los metabolitos de interés depende en gran medida de las fuentes de nutrientes, su composición y un adecuado balance entre estas fuentes (Torres *et al.*, 2011).

### 9.7.3. Rendimiento del extracto etanólico de basidiocarpo de *P. djamor*

El medio B fue quien obtuvo mayor rendimiento con  $39.63 \pm 2.39\%$ , seguido del medio M con  $35.40 \pm 2.86\%$  y por último el medio A con  $32.83 \pm 1.51\%$ . El rendimiento se vio afectado por los diferentes medios de cultivo sólidos en que se produjo el micelio del inóculo, ya que al aplicar el análisis estadístico de varianza de un factor tuvo diferencias significativas (tabla 13; figura 35) entrecada medio.

Tabla 13. Rendimiento de extracto etanólico de basidiocarpo seco de *P. djamor*.

Medios de cultivo	Rendimiento % (extracto/ basidiocarpo seco)
Medio A	$32.83 \pm 1.51$
Medio B	$39.63 \pm 2.39$ a
Medio M	$35.40 \pm 2.86$

Se realizaron 2 extracciones secuenciales de 24 h cada una. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio B presenta diferencia significativa.

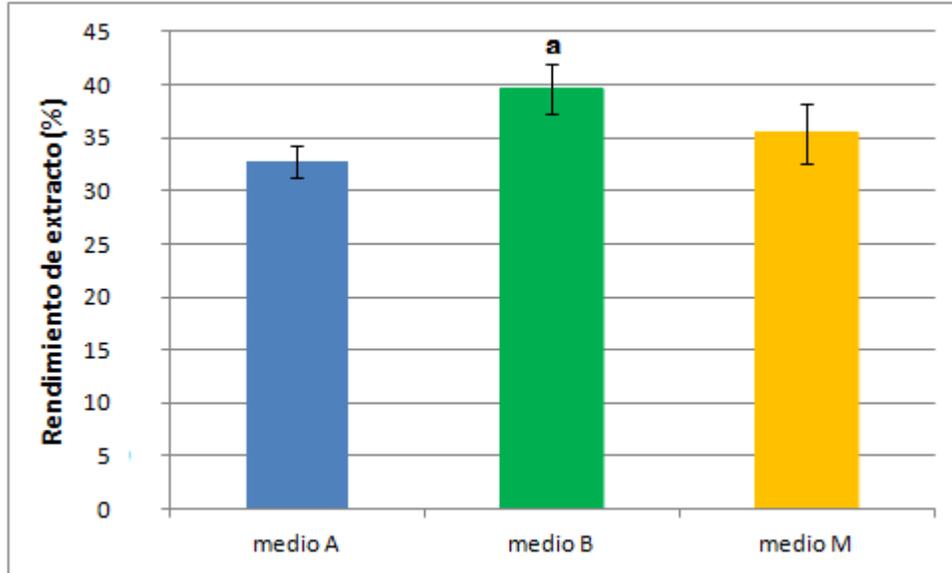


Figura 35. Rendimiento del extracto etanólico seco de basidiocarp de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el medio B presenta diferencia significativa.

De acuerdo al trabajo realizado por Zeng *et al.*, 2012, el rendimiento en porcentaje del extracto metanólico fue de 26.3% para *Morchella elata*, *Suillus lureus* con 39.0% y para la cepa de *P. eryngii* del 37.9%, el cual coincide con los porcentajes obtenidos en el presente trabajo, sin embargo el rendimiento más alto fue para el micelio de *P. djamor* en medio B con  $39.63 \pm 2.39\%$ , lo que se puede relacionar debido a la diferencia que existen entre las técnicas empleadas para la obtención del extracto, por ejemplo, el uso de diferentes solventes, la cantidad de tejido seco utilizado, así como filtrar los extractos en el presente trabajo, también cabe mencionar que son diferentes especies de *Pleurotus* y no son de la misma procedencia.

#### 9.7.4. Contenido de fenoles totales en basidiocarp seco de *P. djamor*

En la determinación de polifenoles encontrados en basidiocarpos secos de *P. djamor* por medio de extracto etanólico (figura 36) en cuerpo fructífero en medio B fue de  $17.91 \pm 3.93 \text{mgGAE/g}$ , seguido del medio M con  $17.08 \pm 2.20 \text{ mg}$ , y por último el A con  $15.56 \pm 3.09 \text{ mg}$ . El contenido de polifenoles en el basidiocarp seco, el medio B con  $7.04 \pm 1.12 \text{ GAE mg /g}$  de basidiocarp seco, seguido por el M con  $6.06 \pm 1.06 \text{ mg}$  y finalizando con el A con  $5.13 \pm 1.19 \text{ mg}$  (figura 37). Los resultados fueron analizados estadísticamente aplicando un ANOVA de un factor y no se obtuvieron diferencias significativas, lo cual

indica que el contenido nutrimental del sustrato no tuvo influencia en el contenido fenólico de los basidiocarpos (tabla 14).

Tabla 14. Fenoles totales en basidiocarpo seco de *P. djamor*.

Medios de cultivo	Contenido fenólico mg GAE/g Extracto	Contenido fenólico mg GAE/g de basidiocarpo seco
<b>Medio A</b>	15.56 ± 3.09	5.13 ± 1.19
<b>Medio B</b>	17.91 ± 3.93	7.04 ± 1.12
<b>Medio M</b>	17.08 ± 2.20	6.06 ± 1.06

Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

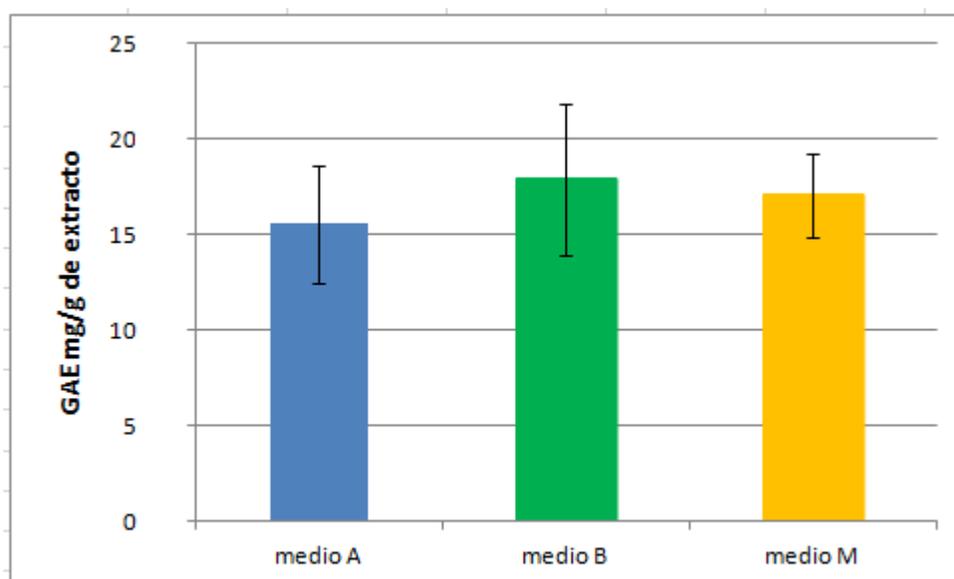


Figura 36. Concentración de fenoles totales en el extracto etanólico de basidiocarpo de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

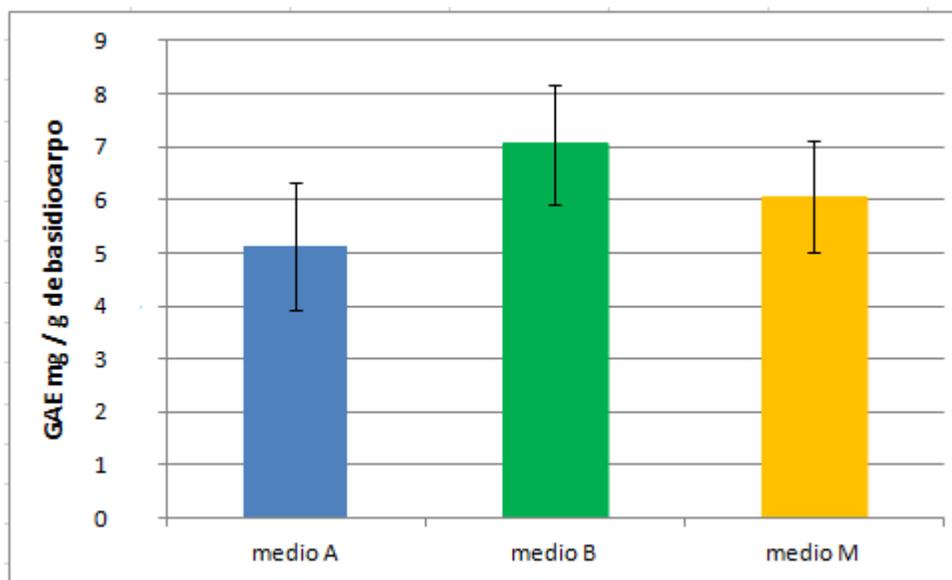


Figura 37. Concentración de fenoles totales de basidiocarp seco de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

En la actualidad se han empleado diversas metodologías para evaluar el contenido fenólico total en hongos, por ello podemos encontrar diferencias en los resultados con otras investigaciones. Ya que en el trabajo realizado por Zeng *et al.*, 2012 reportan el contenido fenólico total de *P. eryngii* en extracto metanólico con  $0.634 \pm 0.004$  mg GAE/g extracto y  $0.180 \pm 0.004$  mg GEA/g de basidiocarp seco. Chirinang *et al.*, 2009 trabajaron con dos tipos de especies, *P. ostreatus* ( $42.47 \pm 2.27$  en extracto acuoso y  $30.93 \pm 1.92$  en extracto etanólico) y *P. sajor-caju* ( $37.98 \pm 1.88$  y  $29.30 \pm 1.60$  respectivamente). Sin embargo en Kim *et al.*, 2009 trabajaron con tres cepas de setas de colores diferentes y los resultados también fueron más altos en cuanto al contenido de fenoles totales con respecto al presente trabajo ya que la cepa de color amarillo (*P. cornucopiae*) fue quien tuvo mayor cantidad de fenoles con  $39.3$  mg GAE/g de cuerpo fructífero, la cepa rosa (*P. salmoneostramineus*) con  $30.1$  mg GAE/g y por último la cepa gris oscuro (*P. ostreatus*) con  $21.2$  mg GAE/g de cuerpo fructífero seco. Las diferencias en los resultados podrían deberse a la cantidad de extracto utilizado en la prueba de Folin-Ciocalteu, ya que emplean cantidades más grandes con respecto al presente trabajo, así como diferente técnica en la preparación del extracto.

#### 9.7.5. Comparación de contenido fenólico total en micelio y basidiocarp de *P. djamor*.

El contenido de polifenoles del basidiocarp es mayor que el del micelio cultivado en los medio A y B, pero no así cuando el cultivo es en el medio M. Ya que la media de micelio

en M es diferente con respecto a la de cuerpo fructífero; por otra parte las medias de basidiocarpo seco no presentaron diferencias significativas entre ellas.

Se realizó una prueba de ANOVA de dos factores para comparar las medias del contenido fenólico total y la influencia de la diferente composición nutricional entre ambos tejidos (figura 38), las diferencias significativas se comprobaron con prueba LSD y rango de error ( $\alpha=0,05$ ) (tabla 15).

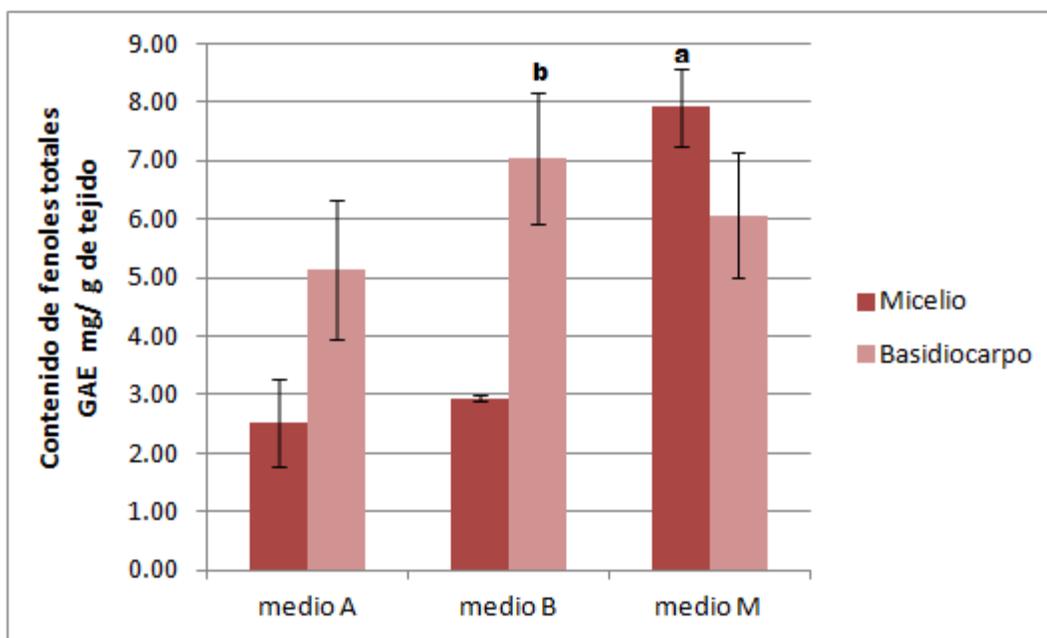


Figura 38. Comparación del contenido fenólico total en el tejido vegetativo y diferenciado en peso seco de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que el contenido fenólico de micelio en medio M presento diferencia significativas.

Tabla 15. Comparación del contenido fenólico total en micelio y basidiocarpo seco de *P. djamor*.

	Contenido fenólico mg GAE/g de micelio seco	Contenido fenólico mg GAE/g de basidiocarpo seco
<b>Medio A</b>	2.51 ± 0.75	5.13 ± 1.19
<b>Medio B</b>	2.94 ± 0.06	7.04 ± 1.12 b
<b>Medio M</b>	7.91 ± 0.65 a	6.06 ± 1.06

Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a y b indican que el contenido fenólico de micelio en medio M y medio B de basidiocarpo presentaron diferencias significativas.

El micelio seco crecido en medio de cultivo líquido M tuvo mayor contenido fenólico. Cabe mencionar que dichos compuestos se encuentran tanto en el micelio como en el cuerpo fructífero, lo que proporciona un mayor valor al empleo de la fermentación en estado líquido para la obtención de compuestos bioactivos de interés farmacológico y alimenticio, debido a que el cultivo tradicional no permite obtener los bioactivos en breves periodos de tiempo (días). Por otra parte, la proporción y variabilidad de estos compuestos varía tanto con el estadio del hongo como con el medio en que es cultivado, en el presente trabajo se utilizaron diferentes sustratos ya que el micelio se cultivo en medio líquido con diferente composición nutrimental y los cuerpos fructíferos se cosecharon en sustrato de paja. Dentro de más variables a considerar y que pueden intervenir en la obtención de metabolitos son las condiciones ambientales, ya que en estado vegetativo, el micelio requiere parámetros controlados, por ejemplo, la temperatura, pH, humedad, intercambio gaseoso; y cuando se cosechan los basidiocarpos, se trató de mantener las mismas condiciones, pero no siempre fue posible (Suárez *et al.*, 2013).

## **9.8. Determinación de la actividad antioxidante de *P. djamor***

### **9.8.1. Actividad antioxidante en micelio de *P. djamor***

La determinación de la actividad antioxidante se evaluó por el porcentaje de decoloración del DPPH contra la concentración del extracto etanólico (24 h), empleándose 450, 900, 1200 y 1500 ppm. Como se puede observar en la figura 37 el medio B con la concentración de 450 ppm logro 8.69% de decoloración, seguida de 900 ppm con 14.63%, luego 1200 ppm con 18.42% y por último con 1500 ppm fue de 27.72%. En M se decoloró a 450 ppm (15.98%), en 900 ppm (25.55%), con 1200 ppm (31.85%) y 1500 (35.72%). En el caso del extracto proveniente del medio de cultivo A, sólo se realizó la evaluación a 450 ppm debido a que la producción de biomasa fue muy baja, la decoloración obtenida fue muy similar a la encontrada para B, entonces posiblemente se comporte de manera similar (figura 39). Ya que en todos los extractos de micelio no se alcanzó el 50% de decoloración de DPPH (tabla 17), entonces fue necesario emplear grandes cantidades de extracto ya que para decolorar el 50% en promedio se emplearon 2337 ppm, debido a lo anterior se considera que tiene poca actividad antioxidante el extracto etanólico de micelio de *P. djamor* crecido en los tres medios de cultivo. En hongos todavía no está estandarizada alguna técnica; y en el caso de la actividad antioxidante en micelio, no se ha reportado algún trabajo para *P. djamor*.

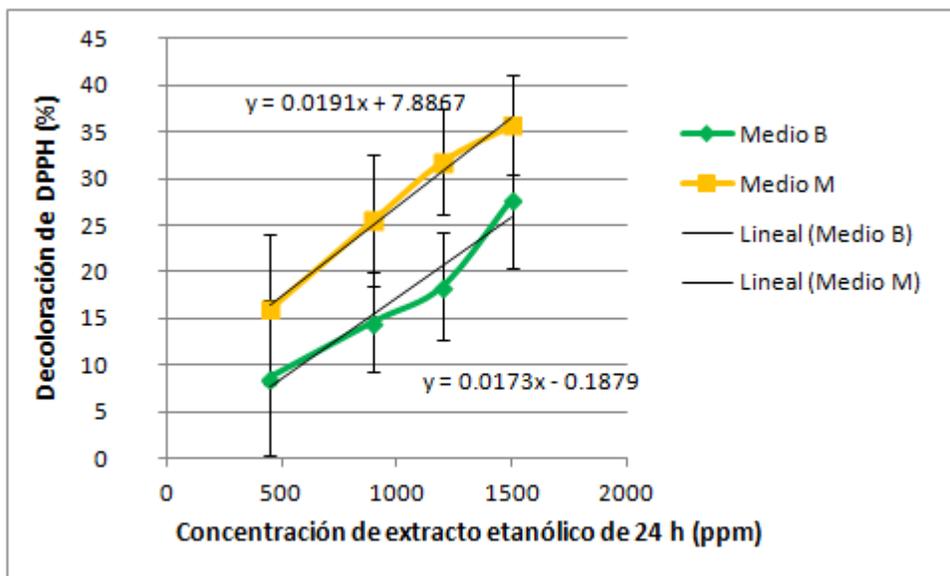


Figura 39. Actividad antioxidante del extracto etanólico (24 h) de micelio de *P. djamor* en medio B y M, con su respectiva ecuación. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

El extracto etanólico de micelio recuperado por segunda ocasión a las 24 h (48 h) tuvo menor porcentaje de decoloración de DPPH (figura 40). Debido a que la producción de biomasa fue irregular sólo se evaluó en el medio B las concentraciones de 450 (15.49%), 900 (24.99%) y 1200 ppm (32.01%). Para el medio M se tuvo como resultado en 450, 900, 1200 y 1500 ppm lo siguiente: 16.68%, 22.04%, 28.08% y 30.75%. La  $CE_{50}$  para medio B fue 2022.45 ppm y en medio M con 2858.34 ppm.

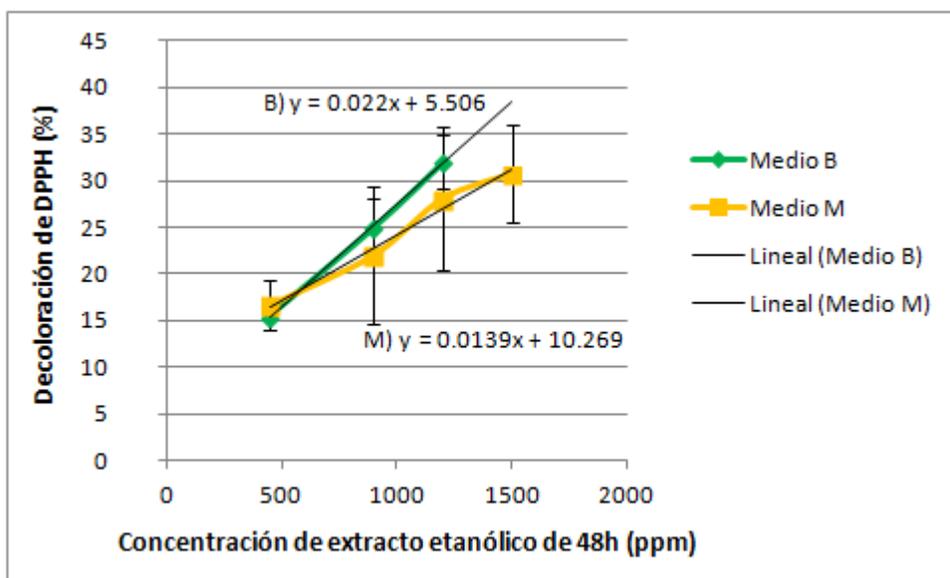


Figura 40. Actividad antioxidante del extracto etanólico (48 h) de micelio de *P. djamor* en medio B y M, con su respectiva ecuación. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

### 9.8.2. Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones del extracto etanólico del micelio seco de *P. djamor*.

La composición nutrimental del medio de cultivo líquido también tiene influencia sobre dicha decoloración, por lo tanto se realizó un análisis estadístico de dos factores para observar cual medio tuvo mayor influencia en la decoloración del DPPH a determinada concentración del extracto etanólico, obteniendo como resultado que si existen diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de decoloración de DPPH y comprobadas con prueba de LSD y rango de error ( $\alpha=0,05$ ), esto quiere decir que si tienen influencia las concentraciones del extracto etanólico (24 h) y la composición nutrimental del medio de cultivo en el porcentaje de decoloración del DPPH. En la concentración de 450 ppm, no se encontraron diferencias significativas ya que el medio B con 14.81% y el medio A con 13.33% de decoloración del DPPH se comportan de manera similar (figura 41).

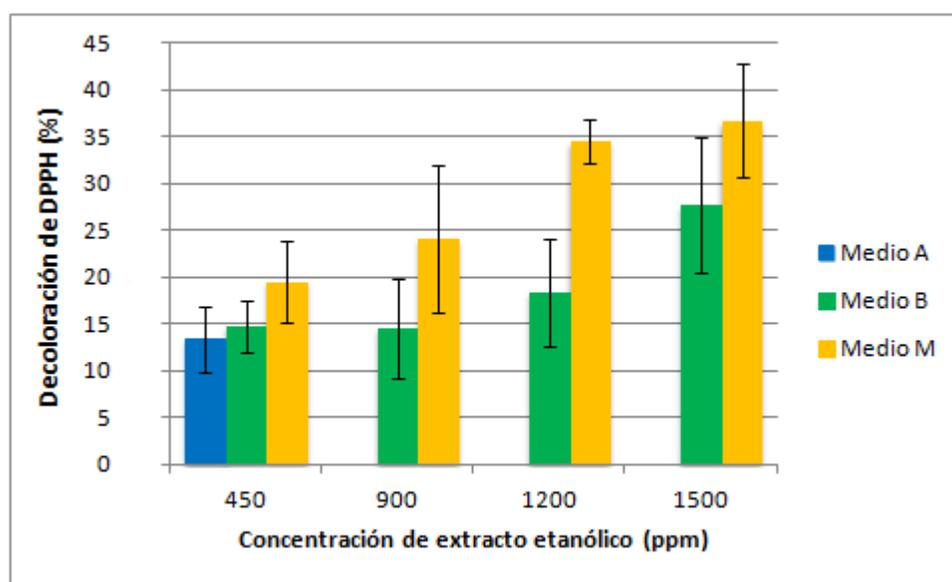


Figura 41. Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones de extracto etanólico (24 h), de micelio de *P. djamor* en los diferentes medios de cultivo. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

### 9.8.3. Actividad antioxidante en basidiocarpo de *P. djamor*.

Los extracto etanólico (24 h) de cuerpos fructíferos de la cepa de *P. djamor* en peso seco, fueron evaluados para determinar su actividad antioxidante dependiendo el porcentaje de decoloración de DPPH. Del extracto de basidiocarpo proveniente del medio A se

obtuvieron los siguientes resultados: para 450 ppm (24.50%), en 900 ppm (40.63%), con 1200 ppm (51.70%) y por ultimo (61.28%), respectivamente. En medio B con 450 (25.31%), 900 (39.89%), 1200 (51.08%) y 1500 (62.33%). Por otra parte, el medio M fue quien obtuvo mayor porcentaje de decoloración de DPPH, en comparación a los otros medios, con 450 ppm (38.45%), 900 ppm (54.99%), 1200 ppm (65.52%), y 1500 ppm (73.36%) (figura 42).

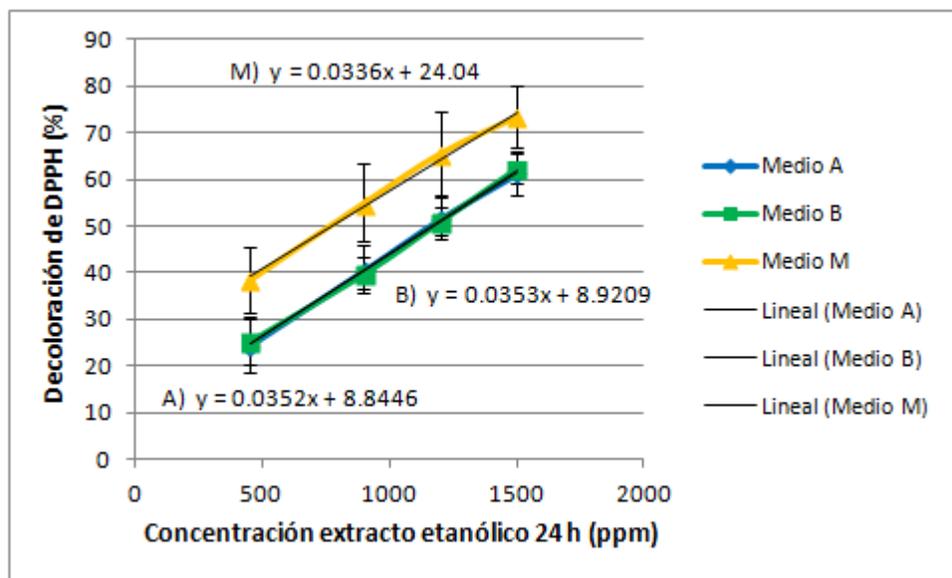


Figura 42. Actividad antioxidante del extracto etanólico (24 h) de basidiocarpo seco de *P. djamor* en medio A, B y M con su respectiva ecuación de la recta. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

Los extractos de basidiocarpo de la segunda extracción de 24 h (48 h) tuvieron porcentajes de decoloración de DPPH más bajos con respecto a los de 24 h. En medio A con 17.43% (450 ppm), 29.45% (900 ppm) y 38.55% (1200 ppm), la producción no fue suficiente para evaluar 1500 ppm. Del material disponible en medio B fueron evaluados: 450 ppm con 21.81% y 900 ppm con 34.67%. En medio M los resultados fueron los siguientes: 450 ppm (20.70%), 900 ppm (31.97%), 1200 ppm (43.08%) y 1500 ppm (54.06%) (figura 43). La  $CE_{50}$  en medio A fue de 1620.17 ppm, en B fue 1435.31 ppm y en M fue 1413.53 ppm.

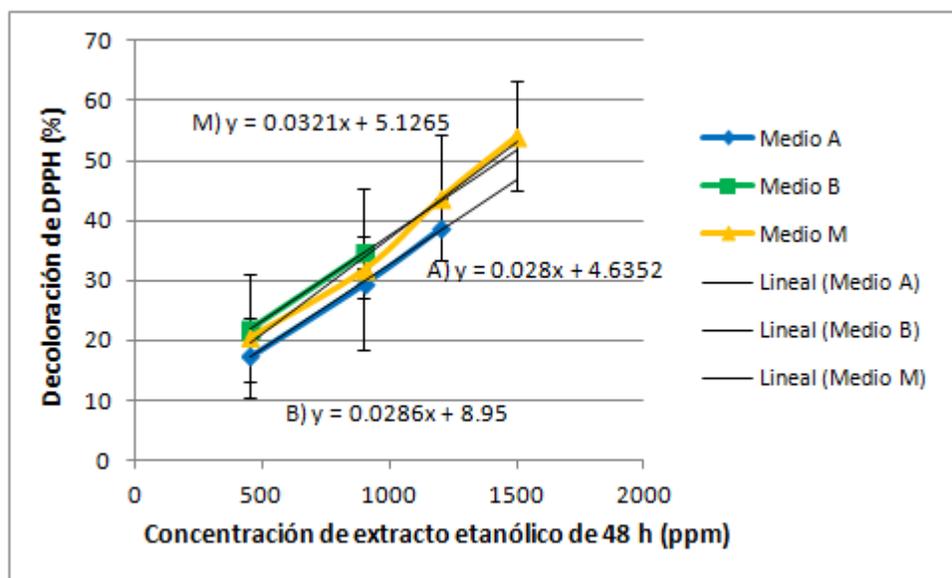


Figura 43. Actividad antioxidante del extracto etanólico (48 h) de basidiocarpo de *P. djamor* en medio A, B y M, con su respectiva ecuación. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

#### 9.8.4. Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones del extracto etanólico (ppm) del basidiocarpo de *P. djamor*.

La composición del medio de cultivo sólido donde fue crecido el micelio de *P. djamor*, si tuvo influencia en la actividad antioxidante de los extractos etanólicos (24 h) de los basidiocarpos. Cabe mencionar que el extracto del medio A se comporta de manera muy similar al del B, y el medio M es quién tuvo mayor actividad antioxidante en todas las concentraciones (figura 44). Los porcentajes obtenidos para cada extracto se evaluaron por medio de un análisis estadístico de varianza de dos factores, obteniendo como resultado que existen diferencias significativas en las medias del porcentaje de decoloración de DPPH por la diferente composición nutricional de los medios de cultivo, se comprobaron con prueba de LSD y rango de error ( $\alpha=0,05$ ). Como podemos observar en la tabla 16 se muestran las diferencias significativas entre las medias de los extractos etanólicos.

Tabla 16. Comparación de la actividad antioxidantes del extracto etanólico (24 h) del basidiocarpo de *P. djamor*, entre los medios de cultivo con diferente composición nutricional.

Concentración de extracto (ppm)	Medio A	Medio B	Medio M
450	24.50 ± 5.71	25.31 ± 5.18	38.45 ± 7.01
900	40.63 ± 5.07	39.89 ± 3.32	54.99 ± 8.34
1200	51.70 ± 4.40	51.08 ± 2.94	65.52 ± 8.86
1500	61.28 ± 4.60	62.33 ± 3.24	73.36 ± 6.57

Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ).

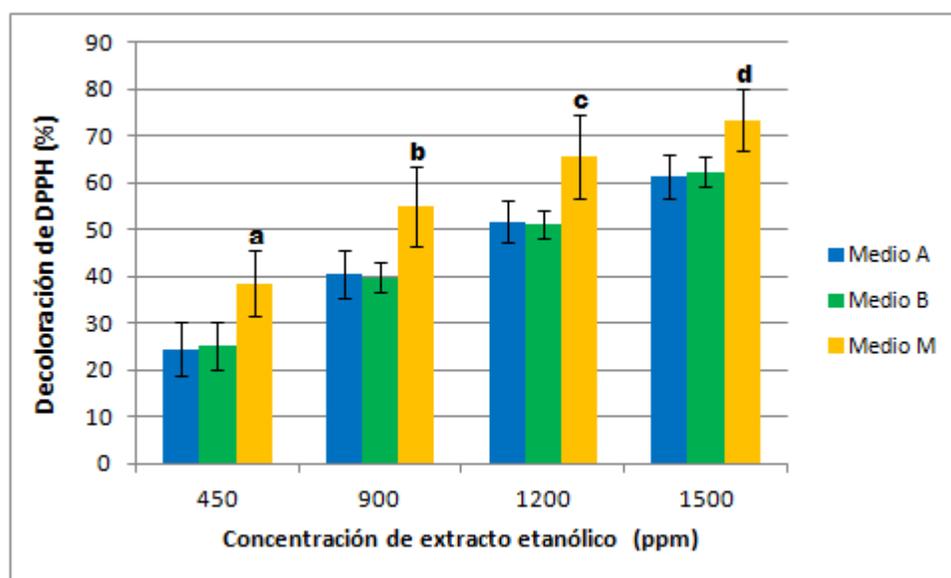


Figura 44. Comparación de la actividad antioxidante por concentraciones de extracto etanólico (24 h), de basidiocarpo de *P. djamor* en los diferentes medios de cultivo. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). Las letras indican que concentración tiene diferencias significativas entre los medios.

#### 9.8.5. Comparación de la actividad antioxidante entre micelio y basidiocarpo de *P. djamor* con la $CE_{50}$ .

En las figuras 39 y 42 se observa que el porcentaje de decoloración de DPPH es directamente proporcional a la concentración de los extractos etanólicos, tanto de micelio como de cuerpo fructífero, describiéndose este comportamiento por un comportamiento lineal, lo que nos facilita el cálculo adecuado de  $CE_{50}$  ya que este valor permite la comparación de la capacidad antioxidante de los extractos provenientes de distintas condiciones.

En el ensayo de micelio, se realizó una extrapolación para obtener el cálculo de la  $CE_{50}$  de los extractos etanólicos de medio B y M (2347.03 y 2328.86 ppm respectivamente).

La concentración de extracto etanólico del cuerpo fructífero en medio M a 900 ppm decoloró el 54.99%, los extractos A y B fueron a 1200 ppm (51.70 y 51.08% respectivamente). Sin embargo, para saber la concentración exacta de la  $CE_{50}$  se calculó por medio de la ecuación de la recta, obteniendo como resultado 769.92 ppm en medio M, en A y B la  $CE_{50}$  es de 1165.25 y 1161.71 ppm respectivamente (Tabla 17). Se evaluaron estadísticamente con ANOVA, obteniendo como resultado que existen diferencias significativas en las medias de las  $CE_{50}$  por la diferente composición nutrimental de los medios de cultivo, se comprobaron con prueba de LSD y rango de error ( $\alpha=0,05$ ). Por tal motivo, podemos decir que el extracto etanólico del basidiocarpo de *P. djamor* en medio M es quien tiene mejor actividad antioxidante.

Tabla 17. Comparación de la  $CE_{50}$  del extracto etanólico de micelio y basidiocarpo seco de *P. djamor*.

Extracto	Micelio $CE_{50}$	Basidiocarpo $CE_{50}$
A	-	1165.25 ± 121.89
B	2347.03 ± 507.72	1161.71 ± 62.69
M	2328.86 ± 581.44	769.92 ± 201.28 a

$CE_{50}$ . Concentración necesaria para la decoloración del 50% de DPPH. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que la  $CE_{50}$  del medio M presenta diferencia significativa.

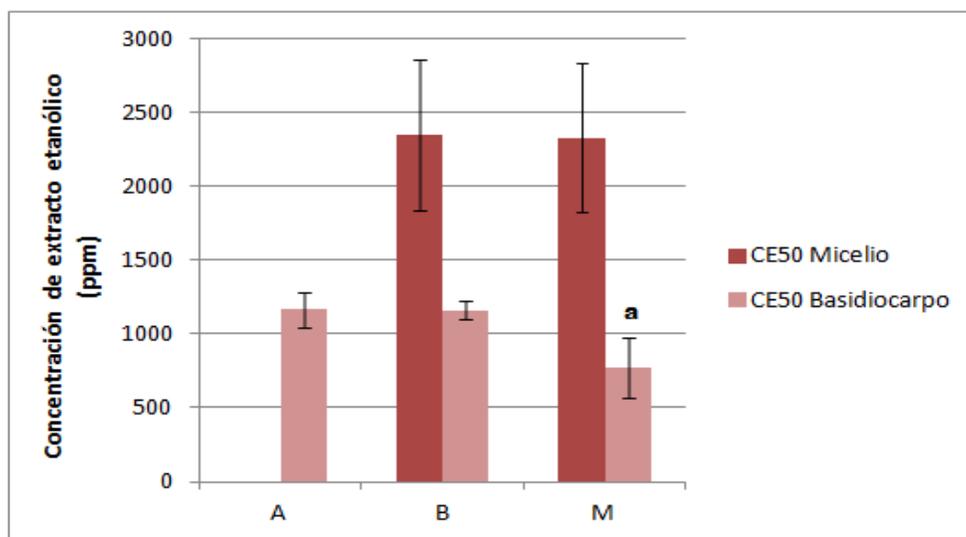


Figura 45. Comparación de actividad antioxidante entre micelio y basidiocarpo de *P. djamor*. Se presenta la media y la desviación estándar ( $\bar{X} \pm DE$ ). La letra a indica que la  $CE_{50}$  del medio M presenta diferencia significativa.

Son pocos los trabajos que reportan la actividad antioxidante para el género *Pleurotus*, así como las técnicas que todavía no son estandarizadas, como es el caso de Córdoba *et al.*, 2009, reportaron sobre la actividad antioxidante de *P. djamor* con extracto etanólico crudo y la CE<sub>50</sub> fue de 115.5 µg/mL, equivalente a 115.5 ppm; los resultados son diferentes a los obtenidos en el presente trabajo ya que la menor CE<sub>50</sub> es de 769.92 ppm para el medio M; la diferencia se puede deber a que utilizaron el basidiocarpo fresco para realizar su extracto etanólico, en el presente trabajo fue secado, también la técnica en la preparación del extracto, ya que sometieron a percolación en etanol durante ocho días y después lo filtraron y destilaron.

En la actualidad falta información de la actividad antioxidante para el hongo de *P. djamor*, en general son muy pocos los trabajos reportados para el género *Pleurotus*, y dentro de los trabajos revisados, los resultados no son similares a los del presente, Chirinang *et al.*, 2009 reportaron actividad antioxidante con extracto acuoso en *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* la CE<sub>50</sub> fue de 11.560 y 13.380 ppm, respectivamente y la CE<sub>50</sub> con extracto etanólico al 95% fue de 31.750 y 58.440 ppm, respectivamente; la diferencia de los resultados se puede deber a los solvente utilizados, ya que en el presente utilizamos etanol al 55%, así como, la diferentes especies de *Pleurotus*. Kim *et al.*, 2009 reportaron actividad antioxidante para tres especies con diferente color de *Pleurotus*, utilizaron extracto metanólico a una concentración de 2000 ppm y concluyeron que la variación de los colores se reflejó en la actividad antioxidante, ya que el porcentaje de decoloración en DPPH, para *P. cornucopiae* (amarillo) fue 84.4%, para *P. salmoneostramineus* (rosa) fue de 54.5% y en *P. ostreatus* (gris oscuro) fue de 29.0%.

En general la actividad antioxidante de los extractos fue baja en comparación con extractos de plantas con reconocida actividad antioxidante por ejemplo el orégano con una CE<sub>50</sub> 0.001 ppm (Delgado *et al.*, 2010), ya que empleamos concentraciones de los extractos relativamente altas.

Mientras más alto es el contenido fenólico, mejor es la actividad de captación de radicales libres (Chirinang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). Lo cual concuerda con el presente trabajo, para ambos ensayos los resultados fueron consistentes, ya que el extracto etanólico del medio M fue quien tuvo mayor contenido de fenoles totales, y el extracto etanólico de micelio y basidiocarpo crecidos en medio de cultivo M, fueron quienes tuvieron mejor actividad de captación de radicales libres.

## 10. CONCLUSIONES

- La cepa CMIZT-13 fue identificada taxonómicamente como *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn. Registrada con el número 4594IZTA.
- La velocidad de crecimiento en micelio de *P. djamor* fue mayor en el medio de cultivo sólido B con 4.33 y 3.69 mm/día para los dos ensayos con 8 y 11 días de incubación respectivamente.
- El medio de cultivo M compuesto por extracto de malta, resultó ser el más adecuado para la producción de biomasa en el cultivo de micelio en medio líquido.
- Ya que los medios de cultivo sólidos y líquidos B y M obtuvieron mejores resultados en la producción de biomasa, indica que es posible su uso para preparar los inóculos en la producción de las setas.
- En la etapa de producción de cuerpos fructíferos, no tuvo influencia el medio de cultivo sólido con diferente composición nutricional en el tamaño de los píleos, ya que no tuvo diferencias significativas.
- Por el tamaño del píleo, los basidiocarpos se clasificaron en la categoría G1 ya que son menores de 5 centímetros.
- Los basidiocarpos de *P. djamor* provenientes de medio de cultivo M tuvieron mayor eficiencia biológica con 268%, así como la tasa de producción con 5%.
- El medio de cultivo M tuvo mayor influencia en la producción de cuerpos fructíferos de *P. djamor*.
- El extracto etanólico proveniente de medio M fue quien tuvo mayor contenido de fenoles totales expresados como mg GAE/ g de micelio seco.
- El contenido de fenoles totales en mg GAE/ g de basidiocarpo de *P. djamor* no dependieron del medio de cultivo empleado para obtener la semilla.
- El extracto etanólico de micelio tiene baja actividad antioxidante y menor que la presentada por los cuerpos fructíferos.
- El extracto etanólico de basidiocarpo derivado de semilla, cultivada en medio M tuvo la más alta actividad antioxidante con una CE<sub>50</sub> de 769.92 ppm.
- El extracto etanólico proveniente del medio M compuesto de extracto de malta tuvo mayor influencia en la actividad antioxidante.
- La propiedad antioxidante del hongo *P. djamor* está íntimamente vinculada con el contenido de compuestos fenólicos.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, D., L. 2007. Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus spp.*, INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. TESIS para obtener el grado en M. en C. México.

Aguinaga B., P. 2012. Evaluación de cuatro sustratos para la producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) en tres ciclos de producción en la zona de tambillo, provincia de Pichincha. Escuela Politécnica Nacional. Tesis para obtener el grado de Ingeniera agroindustrial. Quito.

Avello M., Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 494:161-172.

Barberán T. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 10( 2):41-53.

Bermúdez, R., García N., Mourlot A. 2007. Fermentación solida para la producción de *Pleurotus sp.* sobre mezclas de pulpa de café y viruta de cedro. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Cuba.

Bermúdez R., Morris H., Donoso C., Martínez C., Ramos E. 2003. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus var. florida*. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 22:226-31.

Bernabé G., Cayetano C., Adán D., Torres P. 2004. Cultivo de *Pleurotus pulmonarius* sobre diversos subproductos agrícolas de Guerrero, México. *Revista Mexicana de Micología* 18:77-80.

Brizuela, M., García, L., Pérez, L., Mansur, M. 1998. Bacidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana Micología*. 15: 69-74.

Chirinang P., Intarapichet K. 2009. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia* 35 : 326–331.

Cortés S. A., Mosqueda O. T. 2013. Una mirada a los organismos fúngicos: fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva (online)* 12(2).

Deepalaksmi K., Mirunalini S. 2014. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal Biochemical Technology Society* 5(2): 718-726.

Delgado O., Betanzos C., Sumaya M., 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*. 50:10-15.

Dorado C., Rugerio C., Rivas S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista Facultad de Medicina. UNAM*. 46(6):229-235.

Durán, Á., Cisneros A., Vargas A., 2008. Bioestadística. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 81-92.

Escamilla J., C., Cuevas M., E., Guevara F., J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista Facultad de Medicina. UNAM. 52(2):73-75.

Gaitán H., Almones, D., Pérez M., Mata, G. 2002. Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología, Xalapa, pp 56.

Garzón G., J., Cuervo A., L. 2008. Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 6(10):126-140.

González, B., Garza, O., Salinas, C., Vera, C., Garza, O., Ramírez, G., Torres, A. 2009. Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotoxicidad de dos especies mexicanas de *Suillus spp.* Ciencia UANL, 12:62-70.

González I. 2006. Radicales libres, algunas consideraciones clínicas. Gaceta Médica de Caracas 114(2):91-98.

Gregori, A., Svagel, M., Pohleven, J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus spp.*, Food Technology. Biotechnol. 45:238-249.

Gutiérrez, D., Ortiz, C., Mendoza, A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Memorias del Simposio de Metrología, Universidad Autónoma de Querétaro, México, SM2008-M220-1108.

Gutiérrez S., J. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de..... radicales libres?. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 37(4):69-73.

Guzmán M., Zúñiga, N., Santafé, G., Torres, O., Angulo, A. 2009. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 7(2):63-69.

Huerta P., G. 2002. Capítulo II Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos. En Royse D., Sánchez J., La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Ed. LIMUSA, S.A. de C.V. México. pp. 29-47.

Idareta, E., Larraya, L., Pisabarro, A., Ramírez, L. 2004. Evaluación de parámetros de producción y de calidad en cultivo semi-industrial de cepas de seta ostra *Pleurotus ostreatus* obtenidas mediante selección asistida por marcadores moleculares. Actas de Horticultura. 40:416-419.

Jiménez N., Londoño J., Arango G.J. 2005. Actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad de plantas colombianas de la familia annonaceae. Acta Farmacéutica Bonaerense, 24 (3):337-342.

Kim J., Kim S, Park H., Choi J., Ju Y., Nam K, Kim S.,Lee S. 2009. The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. Journal of Medicinal Plants Research, 3(12):1016-1020.

Kumara D., Varenayam A. 2008. Effect of different substrates on the production and non-enzymatic antioxidant activity of *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom). Life Science Journal 5(3):73-76.

Larraya L., Alfonso A., Pisabarro A., Ramírez L. 2003. Mapping of genomic regions (Quantitative trait Loci) controlling production and quality in industrial culture of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 69(6): 3617-3625.

López C., Ancona M., Medina P. 2005. Cultivo de *Pleurotus djamor* en condiciones de laboratorio y en una casa rural tropical. Revista Mexicana de Micología. 21:93-97.

Maldonado O., Jiménez E., Guapillo M., Ceballos G., Méndez E. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Revista Medica Universidad Veracruzana. 10(2):32-39.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition. 79:727-747.

Martínez D., Larqué A., Aliphat M., Aguilar A., Bonilla M., Martínez W. 2000. La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México. II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT, México. Pp. 193-207.

Martínez D., Morales P., Sobal M., Bonilla M., Martínez W., Mayett Y. 2012. Los hongos comestibles, funcionales y medicinales: su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México. En: Memorias reunión general de la academia Mexicana de Ciencias: Ciencia y Humanismo. Agrociencias. Academia Mexicana de Ciencias. México. Pp 449-474.

Martínez D., Morales P., Sobal M., Bonilla M., Martínez W., Ramírez P., Tello I., Spezzia T., Lira N., de Lima R., Villa S. y Montiel E. 2010. Hacia un desarrollo sustentable del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica, avances y perspectivas en el siglo XXI. Red Latinoamericana de hongos comestibles y medicinales: producción, desarrollo y consumo. Puebla. Pp 91-108.

Martínez D., Sobal M., Morales P., Martínez W., Martínez M., Mayett Y. 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana. Colegio de Postgraduados, Puebla, México. pp 9-17 y 44.

Martínez D., Rugerio V, Rivas A. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Revista Facultad de Medicina UNAM. 46(6): 229-235.

Martínez, F., González, G., Culebras, J., Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Nutrición Hospitalaria, 17 (6): 271-278.

Miller, J., Brzezinska, E. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function, Journal of Dairy Science, 76 (9):2812-2823.

Molyneux. P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakar Journal of Science and Technology, 26 (2): 211-219.

Narayama, K., Reddy, R., Sripal, M., Chaluvadi, M., Krishna, D. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial, Indian Journal Pharmacology. 33:2-16.

Parés R., Juárez A. 2002. Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverté, S. A. España. Pp 324-338.

Pascual M., Calderón V. 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial Diaz de Santos. 2da. Edición. España. Pp 146.

Pérez R., B. 2006. Descripción de las características macroscópicas, de cultivo *in vitro* de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis para obtener el grado de Químico Biólogo. Guatemala. pp 7-10.

Preeti A., Pushpa S., Sakshi S., Jyoti A. 2012. Antioxidant mushrooms: a review. International Research Journal of Pharmacy. 3(6):65-70.

Quiñones, M., Alexandre M., A. 2012, Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 27 (1):76-89.

Ramos E., Castañeda B., Ibáñez L.A. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Revista Académica Perú Salud, 15 (1):42-46.

Ramos M., Batista C., Gómez B., Zamora A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Investigación en Salud. 8(1):7-15.

Rios, M. del P., Hoyos, J., Mosquera, S. 2010. Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca, 8(2):86-94.

Rodríguez E. 2006. Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.

Rodríguez J., Menéndez J., Trujillo Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar. 30(1):36-44.

Royse, D., Rhodes T., Ohga, S., Sanchez J. 2004. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. Bioresource Technology. 91:85-91.

Royse, D., Sanchez, J. 2001. La importancia del cultivo de *Pleurotus spp.* estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Ecosur. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.

Salmones D., Gaitán R., Pérez R., Guzmán G. 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y productividad. Revista Iberoamericana de Micología 14: 173-176.

Salmones D., Mestizo L., Gaitán R. 2004. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. Revista Mexicana de Micología. 18:21-26.

Sánchez, J., Royse, D. "La biología y el cultivo de *Pleurotus sp*", ECOSUR /LIMUSA, México. 2001.

Sánchez J. 2002. Crecimiento y fructificación. En: Royse D., Sánchez J., La biología y el cultivo de *Pleurotus spp*. Ed. LIMUSA, S.A. de C.V. Capítulo III, pp. 51-67.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C. 2005, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45: 297-306.

Song B., C. 2005. Manual del cultivador de hongos 1. Capítulo 1. Introducción a los hongos. Cultivo de setas. Manual para productores. 1ra. Edición. Mushroomworld. pp 1-4.

Suárez C., Jeannette I. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. Revista Iberoamericana. 30(1):1-8.

Tchierpe, M., Hartmann. 1977. A comparison of different growing methods. Journal Mushrooms. 60: 404-416.

Toledo Á., F. 2008. Residuos de Maíz y Quínoa como potenciales sustratos para el cultivo de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*. Tesis para obtener el grado de Ingeniera en biotecnología ambiental. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

Torres A., Quintero J., Atehortua L. 2011. Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. Revista Colombiana biotecnología. 13(1):103-109.

Velázquez M., Prieto B., Contreras R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. Ciencias. 75:36-43.

Villaño D., Fernández M., Moyá M. Troncoso A., García M. 2006. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. ELSEVIER, Pp 6.

Zeng X., Suwandi, J., Doronila, A. 2012. Antioxidant capacity and mineral contents of edible wild Australian mushrooms. Food Science and Technology International, 18(4):369.

Zentella de P., Saldaña B. 1996. Papel fisiológico de los radicales libres. Biología Educativa Bioquímica. México. 15(4):152-161.