



Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial



Tesis presentada en opción al Título Académico de
Máster en Biotecnología

Mención Industrial

**Evaluación in vitro de las potencialidades antimicrobianas
y antioxidantes de extractos crudos de polisacáridos de
Pleurotus sp**

Autor: Lic. Pedro Luis Batista Corbal

Tutores: MSc. Yaixa Beltrán Delgado
Dr.C. Humberto Joaquín Morris Quevedo
PhD, Paul Cos (Universidad de Amberes, Bélgica)

Santiago de Cuba, 2016
"Año 58 de la Revolución"

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Para aquel que ha sustentado mi suerte y en cuyas manos están mis tiempos: A Dios mi Señor sea toda mi gratitud.

A mi amada esposa por soportar todo mi estrés con amor y paciencia.

A toda mi familia gracias. En especial a mi excelente Madre, a mi extraordinario Padre y a mi fenomenal Hermano.

A mis queridos tutores especialmente a la profe Yaixa por el invaluable tiempo que le dedicó a este trabajo.

A todos mis profesores de la maestría que de una manera u otra han contribuido a mi formación profesional.

A mi oponente, el DrC. Luis E Almaguer por las valiosas sugerencias respecto a este trabajo.

A mi colectivo de trabajo de TOXIMED, en especial a Onel Fong y a Grisel Rabel desde el LABEX.

RESUMEN

Pleurotus sp. es un género de hongos superiores ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles-medicinales de alto valor económico. En el presente trabajo se obtuvieron extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp, a los cuales se les determinó la citotoxicidad (Resazurina y rojo neutro); utilizando la línea celular de macrófagos murinos J774, la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y la actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Por otro lado, se determinó el contenido de polisacáridos totales, y la actividad antioxidante de los extractos a través de dos métodos: capacidad antioxidante total (CAT) y poder reductor. La evaluación de la genotoxicidad se realizó con el ensayo de Vitotox™. Los resultados de citotoxicidad por ambos métodos en la línea celular empleada, así como la evaluación antimicrobiana, refieren la no toxicidad y no actividad de los extractos para ambos ensayos con valores de IC₅₀ superiores a 128 µg/mL. Ambos extractos no mostraron actividad genotóxica con el Vitotox™. Los valores referidos al contenido de polisacáridos totales fueron de 53 y 32 g/100g y la CAT de 465.1 y 288.1 µmol Ac. ascórbico/mg para los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpo fructíferos respectivamente. El poder reductor fue mayor para el extracto de cuerpos fructíferos (IC₅₀=8 µg/mL). Las evidencias experimentales obtenidas sugieren el potencial de los extractos derivados de *Pleurotus* sp como nueva fuente de antioxidantes naturales para las industrias alimentaria y médico-farmacéutica.

Palabras claves: Polisacáridos, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, *Pleurotus* sp.

ABSTRACT

Pleurotus sp. is a genus of higher fungi widely distributed worldwide and includes edible and medicinal species of high economic value. In this work, the extracts of polysaccharides crude from mycelium and fruiting bodies of *Pleurotus sp* were obtained. It was determined cytotoxicity (Resazurin and neutral red); using the cell line J774 murine macrophage, antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and antifungal activity against *Candida albicans*. Furthermore, the total content of polysaccharides and the antioxidant activity of the extracts were determined, using two methods: total antioxidant capacity (TAC) and reducing power. Genotoxicity assessment was carried with the test Vitotox™. The results of cytotoxicity by both methods in the cell line employed and antimicrobial evaluation, referred nontoxicity and no activity of extracts for both trials, with IC₅₀ values greater than 128 µg / mL. Both extracts showed no genotoxic activity with Vitotox™. The values referred to the content of total polysaccharides were 53 and 32 g/100g and 465.1 and 288.1 CAT µmol of Ac. Ascorbic / mg for extracts of polysaccharides crude from mycelium and fruiting body, respectively. The value of reducing power was greater for the extract of fruiting bodies (IC₅₀ = 8 µg / mL). Experimental evidence obtained, suggest, the potential of extracts derived from *Pleurotus sp*, as a new source of natural antioxidants for food and medical- pharmaceutical industries.

Keywords: Polysaccharides, antimicrobial activity, antioxidant activity, *Pleurotus sp.*

ÍNDICE

Introducción.....	1
1.1 Generalidades sobre estrés oxidativo.....	5
1.1.1 Estrés oxidativo y hongos comestibles.....	6
1.2 Valor nutricional y potencial medicinal de los hongos comestibles.....	8
1.3 Importancia farmacológica de polisacáridos de hongos comestibles- medicinales.....	9
1.3.1 -glucanos.....	10
1.3.2 Complejo polisacárido-proteína.....	11
1.3.3 Actividad antioxidante de polisacáridos de hongos comestibles- medicinales.....	12
1.3.4 Actividad antitumoral e inmunomoduladora de polisacáridos de hongos comestibles-medicinales.....	12
1.3.5 Actividad antimicrobiana de polisacáridos de hongos comestibles- medicinales.....	13
1.4 Descripción botánica, clasificación taxonómica y aplicaciones de <i>Pleurotus</i> <i>sp.</i>	14
1.4.1 Propiedades antioxidantes de <i>Pleurotus sp.</i>	15
1.4.2 Propiedades antimicrobianas de <i>Pleurotus sp.</i>	16
1.4.3 Propiedades farmacológicas de polisacáridos de <i>Pleurotus sp.</i>	16
2.1 Cepa utilizada y condiciones de cultivo.....	19
2.2 Obtención de los extractos hidrosolubles crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus sp.</i>	19
2.3 Cuantificación de los componentes químicos mayoritarios de los extractos crudos de polisacáridos de <i>Pleurotus sp.</i>	20
2.3.1 Determinación de proteínas.....	20
2.3.2 Determinación de carbohidratos totales.....	20
2.3.3 Determinación de azúcares reductores.....	21
2.3.4 Cuantificación de fenoles totales.....	21
2.4 Citotoxicidad de los extractos crudos de polisacáridos de <i>Pleurotus sp.</i>	22
2.4.1 Cultivo celular.....	22
2.4.2 Citotoxicidad de los extractos crudos de polisacáridos de <i>Pleurotus sp.</i> por el método de la rezasurina.....	22
2.4.3 Viabilidad Celular.....	23
2.4.4 Citotoxicidad de los extractos de <i>Pleurotus sp.</i> por el método del rojo neutro.....	23
2.5 Evaluación antibacteriana y antifúngica de los extractos de <i>Pleurotus sp.</i>	24
2.6 Evaluación de la genotoxicidad de los extractos de <i>Pleurotus sp.</i>	25
2.7 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos de <i>Pleurotus sp.</i>	27

2.7.1 Determinación de la Capacidad Antioxidante Total (CAT) por el método fosfomolibdico.	27
2.7.2 Determinación del Poder Reductor.	28
2.8 Análisis estadístico.	28
3.1 Cuantificación de los componentes químicos mayoritarios de los extractos crudos de polisacáridos de Pleurotus sp.	29
3.1.1 Cuantificación de proteínas	29
3.1.2 Cuantificación de carbohidratos	29
3.1.3 Cuantificación de azúcares reductores	31
3.1.4 Cuantificación de fenoles totales	32
3.1.5 Cuantificación de polisacáridos totales	33
3.2 Citotoxicidad y actividad antimicrobiana de los extractos crudos de polisacáridos de Pleurotus sp.....	35
3.3 Evaluación de la genotoxicidad de los extractos de Pleurotus sp.....	37
3.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos de Pleurotus sp.....	38
3.4.1 Determinación del poder reductor	38
3.4.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante Total (CAT).....	40
Conclusiones	42
Recomendaciones	43
Referencias Bibliográficas.....	45

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas dos décadas, una amplia gama de productos y medicamentos de origen natural han sido aprobados e insertados con carácter terapéutico en el tratamiento de patologías que afectan al hombre. Los productos naturales juegan un rol muy importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas dirigidas a la atención de enfermedades crónicas tales como el cáncer (Newman y Cragg, 2007). Dichas enfermedades, a las que podemos añadir, aterosclerosis, Alzheimer, problemas cardiovasculares, procesos inflamatorios, envejecimiento etc; se asocian en muchos de los casos a fenómenos como el estrés oxidativo, donde intervienen las denominadas especies reactivas del oxígeno (EROs). Estas incluyen a los radicales libres y a moléculas derivadas del oxígeno con una elevada reactividad contra líneas celulares y moléculas de gran importancia en el organismo, como lípidos de membrana y el ADN, siendo esta última la más sensible a daños de esta naturaleza en comparación con otras biomoléculas. Esto a su vez hace necesario la aplicación de ensayos efectivos tanto in vitro como in vivo que permitan examinar y evaluar la magnitud del daño genotóxico y citotóxico, causado por radicales libres, administración de fármacos o productos naturales (Aleksandar et al., 2015).

De igual forma la comunidad científica dirige sus esfuerzos en la búsqueda de compuestos bioactivos de fuentes naturales en el área de la resistencia antibióticos. El tratamiento de enfermedades infecciosas con agentes antimicrobianos continúa siendo un problema para la medicina moderna, ya que muchos estudios, revelan un significativo incremento en la incidencia de resistencia bacteriana y fúngica de un amplio espectro de antibióticos de uso común, como causa del indiscriminado uso de estos fármacos (Ozturk et al., 2011).

Actualmente los productos derivados de hongos comestibles se encuentran entre los de más altos volúmenes de venta en el mercado de alimentos biosaludables en diferentes países. Muchas propiedades medicinales han sido atribuidas a los hongos, al demostrarse que los mismos poseen efectos hipocolesterolémicos, antitumorales, antioxidantes, antivirales, antitrombóticos, inmunomoduladores entre otros (Carvalho et al., 2016).

En tal sentido, se introdujo la denominación de “nutracéutico”, cuando se trata de preparados que poseen una actividad funcional beneficiosa para el organismo pero que, no se adecuan a la presentación y estructura de un alimento convencional. Son, por lo tanto, preparados en polvo, comprimidos, cápsulas, y otras presentaciones no habituales en alimentos. Por ello, los nutracéuticos son empleados comúnmente como suplementos alimenticios, por ejemplo, para complementar determinados tipos de dietas. Dentro de los productos que podemos encontrar en el mercado y que incluyen hongos, destacan los nutracéuticos que se presentan en forma de cápsulas, tabletas o gotas y se comercializan principalmente en EE.UU y Alemania (Arango y Nieto, 2013). También, en los últimos años, han surgido varios productos alimenticios que alegan propiedades funcionales similares a algunos nutracéuticos por la presencia de hongos en sus formulaciones. Así, se pueden encontrar varias marcas de café que incluyen *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazeii* o una mezcla de *Ganoderma* y *Corcicordyceps*. También *Ganoderma* se incluye en los preparados para elaborar chocolates, tés y barritas energéticas. *L. edodes* y algunas especies de *Pleurotus*, se incluyen en la panadería, sustituyendo parte de la harina que se utiliza para su producción (Cheung P, 2008). Variadas son las propiedades beneficiosas para la salud que revelan estos productos funcionales, debido a que han sido descritos, metabolitos derivados de la mayoría de los hongos comestibles, entre los que se destacan los polisacáridos (Ren P, 2012).

Un número importante de polisacáridos han sido aislados de basidiomicetes, representados como homo y heteropolímeros, especialmente glucanos de configuración β , compuestos activos responsables en gran medida de los efectos inmunomoduladores, antitumorales, antioxidantes de estos organismos (Thetsrimuang et al., 2011).

Pleurotus sp. u «hongo ostra» es un género de hongos superiores altamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países. Su atractivo desde el punto de vista nutricional se asocia a numerosos ingredientes bioactivos presentes en estas especies.

Los ejemplares de este género son ricos en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas, minerales, fibra dietética, además de compuestos

antioxidantes. Aunque poseen diferentes acciones biológicas, su mayor interés radica en la producción de polisacáridos inmunoestimuladores y estatinas naturales que son hipocolesterolémicas y que aventajan a las sintetizadas químicamente por sus pocos efectos secundarios (Inácio et al., 2015). Por tanto, los hongos pertenecientes a este género, constituyen un potencial para la obtención de nuevos principios activos, en la búsqueda de alternativas más eficaces y seguras en el tratamiento de enfermedades que afectan al hombre. Diferentes cepas de este género se encuentran depositadas en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Oriente.

En el presente trabajo se planteó como **problema** concreto a abordar:

Las insuficientes evidencias experimentales referentes a las potencialidades farmacológicas, antimicrobiana y antioxidante de extractos crudos de polisacáridos derivados de *Pleurotus sp.*, limitan la utilización de los mismos en el desarrollo de formulaciones con potencialidades terapéuticas.

Hipótesis

“Si existen evidencias experimentales de que polisacáridos derivados de hongos comestibles-medicinales presentan actividades antimicrobiana y antioxidante, entonces es posible que extractos crudos de polisacáridos derivados del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.* muestren efecto protector contra toxicidad mediada por radicales libres, además de acción antimicrobiana, en sistemas experimentales *in vitro*”.

Objetivo general

Evaluar las potencialidades antimicrobianas y antioxidantes de extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus sp.*

Objetivos específicos

1. Obtención de extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.*

2. Determinación del contenido de proteínas, azúcares reductores, carbohidratos, fenoles y polisacáridos totales.

3. Evaluación de la citotoxicidad de extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.* en la línea celular de macrófagos murinos J774, por el método de la resazurina y el rojo neutro.
4. Evaluación de la actividad antibacteriana, antifúngica y antigenotóxica de extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.*
5. Determinación de la actividad antioxidante de extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.*, a través de los ensayos de capacidad antioxidante total y poder reductor.

Novedad

Este trabajo de tesis pretende demostrar que los hongos comestibles-medicinales, tanto en el estado de fructificación como en el de micelio, constituyen candidatos potenciales para la obtención de compuestos de interés para la salud humana, tales como los polisacáridos. Se recomienda además, su empleo en las industrias alimentaria y médico-farmacéutica, en el diseño de alimentos funcionales, suplementos dietéticos y/o fármacos útiles en el manejo de las enfermedades cuyas causas estén asociadas al estrés oxidativo.

Este estudio aporta evidencias experimentales en cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante, además del efecto citotóxico y genotóxico de extractos derivados de un crudo de polisacáridos de *Pleurotus sp.* a través de diferentes ensayos químicos *in vitro*.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Generalidades sobre estrés oxidativo

Los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos celulares que contienen uno o más electrones sin aparear en orbitales atómicos o moleculares (Halliwell y Gutteridge, 1999). Estos son generalmente inestables y atacan rápidamente moléculas cercanas estables. Las principales fuentes de radicales libres pueden ser de orígenes endógenos o exógenos, en el primero de los casos se derivan principalmente del metabolismo propio de los nutrientes, procesos inflamatorios y el propio envejecimiento. En el caso de las exógenas tenemos el consumo de medicamentos, el humo del tabaco, exposición a radiaciones, contaminación ambiental del aire, solventes orgánicos, pesticidas y ejercicios físicos extremos (Cheeseman y Slater, 1993). Los radicales libres son derivados principalmente del oxígeno molecular, ha estos se les llama comúnmente ERO (especies reactivas del oxígeno) y representan la clase más importante de radicales generados en los sistemas vivos (Ferreira et al., 2009). El término ERO incluye no solo radicales libres (radical superóxido, radical hidroxilo) sino también otras moléculas como peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y ozono (Blokhina, 2003). El anión superóxido es considerado como la especie reactiva del oxígeno primaria dada su forma al añadirse un electrón al oxígeno molecular; este interactúa con otras moléculas por medio de enzimas o metales generando ERO secundarias tales como peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Valko et al., 2007).

La producción de las ERO resulta inevitablemente en la aparición del estrés oxidativo cuando la generación de estas especies excede la habilidad propia del organismo para neutralizarlas. A altas concentraciones estas especies reactivas provocan daños estructurales a la célula, a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ridnour, 2004). La membrana lipídica de las mitocondrias es uno de los blancos más frecuentemente atacados, dado que estas constituyen las fuentes más importantes de producción de las ERO. Dichos ataques resultan en lípidos peroxidados y por ende en la producción de radicales lipídicos reactivos como el radical peróxilo (LOO^{\bullet}). Las ERO inducen daño al ADN que involucra roturas de simple y doble cadena. El radical hidroxilo puede causar

lesiones graves a bases púricas por la formación de 8-OH-G un potencial biomarcador de carcinogénesis (Valko, 2006). MDA (malondialdehído)

producto derivado de la peroxidación lipídica puede reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN formando aductos capaces de provocar mutaciones por sustitución (transversión y sustitución), estos cambios de forma permanente resultan en procesos neoplásicos y envejecimiento. La producción incontrolada de radicales libres ha sido asociada a la aparición de más de cien enfermedades incluyendo aterosclerosis, patologías cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer, cirrosis, diabetes, desórdenes neurológicos (Alzheimer, discapacidad cognitiva, Parkinson) entre otras (Rai, 2011).

1.1.1 Estrés oxidativo y hongos comestibles

Como alternativa para contrarrestar el efecto perjudicial de los radicales libres, los organismos aerobios disponen de sistemas de defensa antioxidante, constituidos por moléculas de naturaleza enzimática o no, cuya función principal se centra en evitar el daño oxidativo. Podemos citar como ejemplo a la superóxido dismutasa (SOD), encargada de la dismutación del $O_2 \cdot$ a H_2O_2 , reacción que es continuada por la catalasa (CAT) y por la glutatión peroxidasa (GPx) que convierten el H_2O_2 en H_2O . La actividad de cada una de estas enzimas debe realizarse de forma armónica para mantener el equilibrio REDOX intracelular (Sánchez y Méndez, 2013).

No obstante, la efectividad de estos sistemas se ve comprometido en el transcurso de la vida por lo que resulta de vital importancia la incorporación de metabolitos con actividad antioxidante por medio de la dieta, moléculas capaces de actuar por si mismas en la captación de radicales libres o de aportar en el aumento celular de antioxidantes endógenos (Obodai et al., 2014). En tal sentido las setas comestibles se alzan dentro de los alimentos de elección en los que abundan moléculas con capacidad secuestradora de radicales libres, pasando a formar parte de la amplia gama de alimentos con dicha capacidad como verduras, frutas, cereales o pescados. Se ha demostrado que un buen número de hongos comestibles podrían ser utilizados como antioxidantes naturales por su alto potencial frente al estrés oxidativo (Kim et al., 2008; Liu et al., 2012; Palacios et al., 2011; Reis et al., 2012b).

Revisión Bibliográfica

Al revisar la composición química de los hongos comestibles, los compuestos fenólicos sobresalen como sustancias antioxidante predominantes, de las

cuales se han identificado más de 8000 estructuras entre compuestos simples y altamente polimerizados. A estos se une además los flavonoides, con más de 5000 tipos distintos (Myburgh, 2014). Las setas también se destacan por la presencia de vitaminas como compuestos antioxidantes, ejemplo de ello tenemos a los tocoferoles, la vitamina C y los β -carotenos. Los primeros dirigen su actividad sobre membranas biológicas y lipoproteínas (Heleno et al., 2012). La vitamina C al actuar como cofactor de numerosas enzimas sobresale en la disminución de las peroxidaciones lipídicas y lipoproteicas mejorando de esta forma la función vascular (Yavari, 2015). Estudios recientes demuestran de manera general una buena correlación ($R^2=0.8181$) entre los fenoles totales y la actividad de barrido del radical DPPH, de igual forma con un ensayo de poder reductor ($R^2=0.8546$) y CUPRAC ($R^2=0.8289$) (Abdullah et al., 2012).

En diversas especies de hongos se ha encontrado que los principales compuestos antioxidantes son: los ácidos cafeico, clorogénico, coumarico, ferúlico, fállico, gentísico, hidroxibenzoico, homogentísico, y protocatéquico, además de la catequina, el pirogalol, y la miricetina; esos compuestos son solubles en alcohol (Barros et al., 2009). Un estudio realizado por Palacios et al., 2011, en el que exploraron las propiedades antioxidantes de ocho hongos comestibles (*Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus*), resultó ser el ácido homogentísico el ácido fenólico libre más significativo presente en todas las especies evaluadas a pesar de la variación de su concentración dependiendo del ejemplar evaluado. La actividad antioxidante se evaluó por la autooxidación del ácido linoleico demostrando todas las especies actividad inhibitoria como *C. cibarius* exponente de mejor actividad (74% de inhibición) y con *A. bisporus* como la especie con la actividad antioxidante más baja (10% de inhibición).

Los hongos comestibles cuentan con una amplia gama de metabolitos bioactivos responsables en muchos de los casos de sus excelentes propiedades antioxidantes, los cuales ayudan a prevenir la ocurrencia de enfermedades no trasmisibles como el cáncer y patologías cardiovasculares

(Vikineswary & Chang 2013). Dentro de estos metabolitos podemos encontrar enzimas como glucosas oxidasas, peróxido dismutasa, peroxidasas y lacasas,

estrechamente relacionadas con la prevención del estrés oxidativo (Wasser 2010; Chang & Wasser 2012). Extractos acuosos y metanólicos de *A. aurícula-judae* y *P. eryngii* mostraron interesantes propiedades antioxidantes y de reducción de citotoxicidad H₂O₂ inducida, en fibroblastos de bebés hámsters. Además, se demostró que la catequina, el ácido gálico y el ácido cafeico son los principales componentes fenólicos en los extractos. Se indica claramente que los extractos acuosos fueron más eficaces que los extractos metanólicos en la actividad antioxidante utilizando la capacidad de barrido de los radicales DPPH y la peroxidación lipídica, mientras que los extractos metanólicos fueron más eficaces en la capacidad quelante de iones ferrosos (Feyza y Belma, 2011).

1.2 Valor nutricional y potencial medicinal de los hongos comestibles.

Los hongos son organismos que poseen características particulares que los diferencian de los animales y las plantas. La no utilización de la clorofila por parte de los mismos denota su forma de vida heterótrofa. Son poseedores de una amplia gama de enzimas que les permiten degradar sustancias de naturaleza complejas presentes en los medios en los cuales se desarrollan y de esta forma nutrirse (Baek-Cho, 2005).

Existen diversos grupos taxonómicos dentro del reino fungi, de los que se conoce alrededor de 72 000 especies, la mayoría se incluyen dentro del phyla Ascomycota (más de 30,000 especies) y Basidiomycota (más de 20,000), siendo los Basidiomicetos el grupo más importante dentro de los hongos superiores por ser en su mayoría comestibles y por ende evidencian su atractivo económico en el mercado internacional de alimentos (García-Gonzales, 2005).

Históricamente, los basidiomicetes, han tenido un largo y exitoso uso medicinal, especialmente en la medicina tradicional. En la actualidad el interés por productos medicinales derivados de los hongos crece vertiginosamente. Corporaciones principalmente Asiáticas se ubican a la vanguardia en lo referente a la producción y comercialización de estos productos. En su mayoría

están siendo usados por médicos holísticos, quiroprácticos y médicos naturopatas y naturistas en un ambiente clínico (Pérez-Armendáriz et al., 2010).

Los hongos son ricos en proteínas, especialmente en su forma seca, en fibra, con gran capacidad prebiótica, vitaminas, especialmente riboflavina y niacina, así como minerales y enzimas. Son relativamente pobres en azúcares simples y grasas. Sin embargo, su valor terapéutico no reside tanto en sus nutrientes, sino en sus principios activos (Carvalho et al., 2007). En las últimas décadas buena parte de la comunidad científica se ha dado a la tarea de realizar estudios dirigidos a la determinación y comprobación de las diversas actividades biológicas de metabolitos secundarios presentes en setas comestibles, entre las que se encuentran actividades antioxidantes, hipocolesterolémica, hipoglucémica, antibacteriana, antiviral, reguladora del sistema cardiovascular, anticancerígena e inmunomoduladora (Suárez et al., 2013). Dichos efectos han sido atribuidos a hongos de uso tradicional tales como los del género *Ganoderma*, *Lentinus*, *Agaricus*, *Grifola*, *Pleurotus*, *Trametes* (*Coriolus*), *Schizophyllum*, *Lactarius*, *Phellinus*, *Tremella*, *Russula*, entre otros (Patel & Goyal 2012; Vikineswary & Chang 2013). El género *Ganoderma* se alza con la supremacía dentro de los hongos medicinales seguido por *Lentinus* y *Pleurotus* (Patel et al. 2012).

Las setas comestibles son conocidas por su alto valor proteico, su considerable concentración de vitaminas, minerales, fibra dietaria, bajos niveles de sodio y grasas insaturadas. Esto las convierte en un excelente nutracéutico ya que sus propiedades medicinales están directamente relacionadas con los compuestos que presentan acciones biológicas con potencial terapéutico. Dichos compuestos se pueden aislar tanto del micelio como del carpóforo y del medio de cultivo agotado. Dentro de estos se encuentran β -glucanos, enzimas, policétidos, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides y terpenoides, entre otros (Suárez et al., 2013).

1.3 Importancia farmacológica de polisacáridos de hongos comestibles-medicinales.

Entre los compuestos bioactivos de los hongos, los polisacáridos son los que presentan mayor actividad antitumoral, antiviral e inmunomoduladora (Mizuno y Nishitani, 2013). Los polisacáridos que se encuentran en la pared celular son

los que presentan mayor bioactividad. Dentro de los principales exponentes de este grupo tenemos a la quitina, celulosa, -glucanos y complejos polisacáridos

proteína (Zhang et al., 2007). Estos polisacáridos biológicamente activos se pueden encontrar en los cuerpos fructíferos, en el micelio cultivado e incluso ser extraídos del medio donde se cultivan.

Existen numerosos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, en los que se han aislado β -glucanos y complejos polisacáridos-proteína de diferentes hongos y se ha demostrado que éstos tienen importantes propiedades biológicas como agentes inmunomoduladores, antitumorales, hipoglicémicos y antioxidantes (Cheung, 2010). Hasta el momento la Farmacopeia China incluye en su listamás de cien especies de hongos con usos medicinales donde los polisacáridos de hongos han sido usados alrededor de tres décadas como adyuvantes en radio y quimioterapias contra el cáncer (Martel et al., 2014).

1.3.1 β -glucanos

Es importante destacar algunos de los polisacáridos más conocidos presentes en hongos comestibles, dentro de los que se encuentran los β -glucano y a los que se les atribuye disímiles propiedades medicinales. Los β -glucanos son polisacáridos no celulósicos constituidos por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos y con ramificaciones β -1-3 o β -1-6. Son aislados principalmente de la pared celular de las células fúngicas (aproximadamente la mitad de la biomasa de la pared celular está constituida de β -glucanos), aunque también pueden ser excretados al medio. Poseen actividades inmunoestimuladoras, anticancerígenas, antiinfecciosas, hipocolesterolémicas, hipoglucémicas, antiinflamatorias y analgésicas (Smiderle, 2008).

Pleuran, es un polisacárido tipo β -glucano que se encuentra en las especies de hongos que componen el género *Pleurotus*. Este polisacárido tiene una significativa actividad anticarcinogénica y estimulante de la inmunidad (Khan y Tania, 2012). Jesenak et al., 2013, demostraron que el Pleuran reduce la morbilidad causada por infecciones recurrentes de las vías respiratorias a través de la modulación de la inmunidad humoral y celular.

El β -glucano más conocido a nivel mundial es el **Lentinan**, aislado de *L. edodes* (Shiitake), polisacárido de 27,5 kDa que es utilizado en Japón como una medicina anticancerígena debido a que estimula la secreción de citosinas

por células T, lo que incrementa la generación de linfocitos T citotóxicos y células NK en presencia de interleucina II (Zhang et al., 2011).

Otro ejemplo lo constituye **Ganopoly**, polisacárido aislado de *Ganoderma lucidum*, uno de los hongos con más propiedades medicinales que se conocen. Las propiedades bioactivas de Ganopoly están en concordancia con lo descrito anteriormente para Pleuran y Lentinan. Posee elevada actividad antitumoral, demostrándose su eficacia clínica en las terapias anticancerígenas. La actividad antidiabética que se le asocia viene determinada por su capacidad para bajar el nivel de glucosa post-prandial en pacientes con diabetes tipo II (Gao et al., 2004). Se ha demostrado también que este polisacárido puede actuar como un potente inmunoestimulante (El Enshasy y Hatti-Kaul, 2013).

Grifolan, es un β -glucano extraído del hongo *Grifola frondosa*. Este compuesto posee importantes propiedades medicinales, entre ellas la de promover la actividad de los macrófagos e incrementar la producción de la interleuquina IL-1 mejorando la respuesta inmune. A este compuesto se le atribuye también actividad antifúngica, según Uchiyama et al., 2002 es capaz de suprimir el hongo patógeno *Candida albicans*, que puede causar infecciones de las membranas de la cavidad oral y sistémica incluso infecciones de los pulmones, los ganglios linfáticos, el hígado y el bazo. En un estudio en ratones se observó que Grifolan puede suprimir la inflamación de las membranas mucosas del tracto respiratorio (Korpi et al., 2003)

1.3.2 Complejo polisacárido-proteína

Los complejos polisacárido-proteína se asocian al incremento de la respuesta inmune, tanto la innata como la celular, además de poseer actividad antitumoral en animales y en humanos. La estimulación de los sistemas de defensa inmune del huésped por polisacáridos bioactivos procedentes de hongos medicinales tienen un efecto significativo sobre la maduración, la diferenciación y la proliferación de muchos tipos de células inmunes en el huésped (Wasser, 2011).

De forma similar a la acción que ejercen los complejos polisacáridos-proteína, las glicoproteínas y los complejos polisacáridos-péptidos muestran también una actividad antitumoral e inmunomoduladora importante. Un estudio realizado al hongo *Trametes versicolor* permitió dilucidar dos compuestos muy interesantes,

un complejo polisacárido-proteína soluble en agua, el polisacárido-K (PSK), de nombre comercial krestino, y un polisacárido-péptido (PSP) ambos obtenidos

de su micelio, y con una extraordinaria actividad inmunopotenciadora y anticancerígena (Rowan et al., 2002).

1.3.3 Actividad antioxidante de polisacáridos de hongos comestibles-medicinales.

Estudios han demostrado que la actividad antioxidante de preparados a base de hongos no solo se debe en su gran mayoría a compuestos fenólicos, sino también a la presencia significativa de polisacáridos que estos poseen. Khan et al., 2014, evaluó la capacidad antioxidante referida a la inhibición de la peroxidación lipídica de β -glucanos extraídos de hongos comestibles (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Coprinus atramentarius*), siendo el glucano aislado de *C. atramentarius* el de mayor actividad con respecto a los dos restantes.

1.3.4 Actividad antitumoral e inmunomoduladora de polisacáridos de hongos comestibles-medicinales.

Dentro de la amplia gama de compuestos bioactivos derivados de los hongos, los polisacáridos parecen ser los más potentes en cuanto a actividad antitumoral. Estudios científicos muestran que los polisacáridos de los champiñones pueden evitar la oncogénesis, por su actividad antitumoral directa contra varios tumores y además previenen el proceso de metástasis tumoral. Su actividad se incrementa cuando se utiliza unido a la quimioterapia (Wasser, 2011). Otro ejemplo es la administración de Lentinan en pacientes sometidos a quimioterapia con cáncer de estómago, colon y otros carcinomas observándose el incremento de la calidad de vida en comparación con pacientes que sólo se les trataba con quimioterapia (Hazama et al., 1995).

La evidencia clínica más importante de actividad antitumoral e inmunomoduladora la obtenemos de preparaciones comerciales de polisacáridos, tales como, Lentinan (derivado de *L. edodes*), PSK (Krestin) (derivado de *Trametes versicolor*) y Esquizofilano (derivado de *Schizophyllum commune*) (Chang & Wasser 2012; El Enshasy & Hatti-Kaul 2013). Los polisacáridos de hongos han demostrado notable actividad inmunomoduladora

y antitumoral *in vivo*, dentro de los que resaltan ejemplares pertenecientes a diferentes órdenes como: Auriculariales, Tremellales, Polyporales entre otros

(Wasser 2002). Además de su potencial en la regulación del sistema inmune y actividad antitumoral, los polisacáridos son ingredientes biológicamente activos útiles en procesos de terapias post-radiación como anticoagulante, contra el VIH y como hipoglucemiantes. (Shenbhagaraman et al., 2012).

1.3.5 Actividad antimicrobiana de polisacáridos de hongos comestibles-medicinales.

La búsqueda por parte de la comunidad científica de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana ha aumentado en los últimos tiempos; y los hongos comestibles medicinales constituyen candidatos potenciales en tal aspecto. Los mismos contienen carbohidratos como, la quitina, hemicelulosa, grupos β -glucanos, mananos, xilanos y galactanos, que según reportes estos grupos de polisacáridos muestran actividad antibacteriana (Zhu et al., 2012; He et al., 2010)

Hasta el momento los estudios referidos a la actividad antibacteriana de polisacáridos de fuentes variadas, permite especular que los mismos están implicados de manera importante en la prevención de la descomposición y toxicidad de alimentos, además de su aplicación en la esfera médica; teniendo en cuenta la estructura de los mismos, además de características conformacionales y funciones biológicas. Por tal motivo varios autores coinciden en que los mecanismos de bioactividad funcional de los polisacáridos de hongos comestibles deben ser estudiados más a fondo. (Zhu et al., 2012; He et al., 2010).

Según estudios realizados los polisacáridos tienen varios objetivos de acción contra las bacterias, incluyendo la pared celular (filtración de proteínas), la membrana citoplasmática (permeabilidad de la membrana) y el ADN (unión al ADN), de acuerdo a fotografías tomadas por microscopía electrónica. La estabilidad al calor y no toxicidad que presentan los polisacáridos los convierte en candidatos potenciales para ser usados como antimicrobianos en alimentos (He et al., 2010).

1.4 Descripción botánica, clasificación taxonómica y aplicaciones de *Pleurotus* sp.

La palabra *Pleurotus* deriva del griego “pleuro”, que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo (Cardona y Cadavid, 1999).

Taxonómicamente se clasifica de la siguiente forma:

- Reino: Fungi
- Clase: Basidiomycetes
- Orden: Agaricales
- Familia: Pleurotaceae
- Género: *Pleurotus*

Los hongos del género *Pleurotus*, crecen como saprófitos en trozos de plantas vivas o muertas. Se consideran de “pudrición blanca” por degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa (Sánchez y Royse, 2002). Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo. Los caracteriza un rápido crecimiento, una gran habilidad del micelio para colonizar el sustrato, así como una alta adaptabilidad y productividad. Su producción fácil y poco costosa. La mayoría de las especies son comestibles, con alto valor comercial, por lo que también son extensamente cultivadas (Cohen et al., 2002).

El género *Pleurotus* comprende 40 especies diferentes que se conocen comúnmente como "Setas", a las que se asocian importantes propiedades medicinales, ambientales y biotecnológicas. La producción de *Pleurotus* sp. es económicamente significativa en la industria alimenticia a nivel mundial. El cultivo del *Pleurotus ostreatus* constituye la tercera parte del total de cultivos de hongos de importancia alimentaria. Es conocido por poseer un característico sabor y propiedades aromáticas, además de ser rico en proteínas, fibras, carbohidratos, vitaminas y minerales. *Pleurotus ostreatus* contiene mayores concentraciones de cisteína, ácido aspártico y la metionina que otros hongos comestibles, como *Agaricus bisporus* y *Lentinus edodes* (Jayakumar et al., 2011).

Revisión Bibliográfica

Varias investigaciones por parte de la comunidad científica a nivel mundial confirman la importancia nutricional del género *Pleurotus* basados en la presencia de compuestos bioactivos como terpenoides, esteroides, fenoles,

alcaloides, lectinas, polisacáridos, entre otros. Estos metabolitos pueden ser aislados de cuerpos fructíferos, micelios y medios de cultivos en los cuales crecen y se desarrollan, siendo responsables además de importantes propiedades farmacológicas tales como: antivirales, antioxidantes, antitumorales, antibióticas, antibacterianas, hipocolesterolémicas e inmunomoduladoras. (Lindequist et al., 2005).

1.4.1 Propiedades antioxidantes de *Pleurotus* sp.

El uso de antioxidantes sintéticos en el mercado tales como el butilhidroxianisol (BHA) y el hidroxiltolueno butilado (BHT), está siendo objeto de cuestionamiento actualmente, dada las sospechas de su potencial carcinogénico. Por lo tanto, la atención en compuestos antioxidantes de origen natural es cada vez mayor, siendo las setas comestibles excelentes candidatos en este sentido, entre las que se destaca el género *Pleurotus*, gracias a la riqueza metabólica que posee, asociada directamente con su potencial antioxidante.

Dentro de los compuestos de mayor interés se encuentran los fenoles, excelentes antioxidantes y sinergistas. Estudios revelan que extractos etanólicos de *Pleurotus ostreatus*, poseen potente efectividad en la eliminación de radicales hidroxilo en comparación con un estándar de ácido ascórbico siendo de 56,2% y 60,17% respectivamente (Jayakumar et al., 2009). Además, en este mismo estudio se demostró el poder reductor del extracto etanólico, observándose un aumento cada vez mayor en proporción directa a la creciente concentración del extracto. El poder reductor de los hongos medicinales puede deberse a su capacidad de ser donadores de hidrógeno.

Así también se ha informado de que el tratamiento de ratas envejecidas con un extracto del hongo *P. ostreatus* produjo un aumento de las actividades de CAT, SOD, GPX, GR y GST y mejoras en los niveles de GSH, vitaminas C y E en el hígado, los riñones y el corazón y el cerebro. El glutatión reducido (GSH) y sus enzimas relacionadas, desempeñan un papel clave en la protección de la célula contra los efectos de las especies reactivas de oxígeno (Nordberg y Arner, 2001).

GSH son regenerados por el reciclaje redox, en el cual el glutatión disulfuro (GSSG) es reducido a GSH por la glutatión reductasa (GR), con consumo de NADPH. La administración en ratas envejecidas de un extracto del hongo *P.ostreatus* restauró la actividad de GR, esto se debió posiblemente a una mejora en el estado glutatión que pudo estar causada por los componentes del extracto (Jayakumar, Thomas, y Geraldine, 2010).

1.4.2 Propiedades antimicrobianas de *Pleurotus* sp.

Compuestos identificados dentro del género *Pleurotus* presentan actividad antimicrobiana, como anisaldehído en *P. eryngii*, pleuromutilina en *P. mutilus* y *P. griseus*, Pleurano, 3-octanona, 3-octanol, 1-octan-3-ol, benzaldehído, 1-octanol, ácido benzoico, *p*-anisaldehído en *P. ostreatus* y Pleurotina en *P. griseus*. (Cruz, 2011).

Rahman et al., 2009, trabajaron con el extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* (Jacquin ex Fr.), el cual mostró efecto contra microorganismos patógenos (entre ellos: *Klebsiella* sp. y *Staphylococcus* sp.) usando medio Mc Conkey. En cambio, la actividad antimicrobiana del extracto de alcohol metílico obtenido del medio de cultivo de *P. eryngii* var. *ferulae* mostró inhibir el crecimiento de algunas bacterias y que el diámetro de esta inhibición osciló entre 7.7 a 13 mm. Las bacterias estudiadas fueron *B. megaterium*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Trichophyton* spp., y *Epidermophyton* spp. (Akyuz y Kirbag, 2009).

Otros autores también reportaron que una cepa híbrida de *Pleurotus* spp. SAUA (SEC1xUAP91) provocó halos de inhibición contra las bacterias antes mencionadas, donde *Y. enterocolitica* presentó los mayores halos de inhibición, en cambio, *K. pneumoniae* presentó los más pequeños y la CMI fue de 0.75 mg/mL para la bacteria *S. aureus*.

1.4.3 Propiedades farmacológicas de polisacáridos de *Pleurotus* sp.

Estudios químicos realizados al género *Pleurotus* ha reportado diferentes componentes polisacáridicos. El hongo *P. pulmonarius* contiene diferentes

polisacáridos en sus cuerpos fructíferos los cuales han sido identificados: Xiloglucano, Mannogalacto glucano, Mannogalactano y Glucoxilano (Ferreira et

al., 2010; Wasser, 2002). Este tipo de compuestos están relacionados con la actividad antitumoral e inmunomoduladora.

Además, los polisacáridos de los hongos pueden potenciar los sistemas de defensa *in vivo* contra el daño oxidativo. Los cuerpos fructíferos de *Pleurotus abalonus* producen un complejo polisacárido-péptido (F22) capaz de aumentar la actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes y de reducir la peroxidación lipídica en ratones con senescencia acelerada (Li et al., 2007). El Pleuran, otro α -1,3-D-glucano que se extrae de *Pleurotus ostreatus* mejora el estatus antioxidante de las ratas, aumenta la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-PX) y glutatión reductasa (GRD) (Bobek y Galbavy, 2001).

Zhang et al., 2012 demostraron que dos fracciones polisacarídicas (PSPO-1a y PSPO-4a) aisladas de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* exhibieron una potente actividad de barrido del radical DPPH y anión superóxido a medida que se aumentaba la concentración, no así en el caso del radical hidroxilo. Otros investigadores también han reportado barridos de radicales y activación NOS (óxido nítrico sintasa) por parte de extractos acuosos crudos de polisacáridos de *P. ostreatus*, asociando tal actividad antioxidante a la presencia significativa de β -glucanos en las muestras (Mitra et al., 2013).

Un polisacárido intracelular con presencia de zinc (IZPS), fue aislado y purificado en tres subfracciones (IZPS-1, IZPS-2 y IZPS-3) a partir de *P. cornucopiceae*, utilizando cromatografía de intercambio iónico. Dichas fracciones demostraron potente actividad de barrido del anión superóxido y radical DPPH además de fuerte actividad en el ensayo de poder reductor *in vitro*. Se encontró además que todas las fracciones fueron capaces de actuar positivamente en la regulación de la superóxido dismutasa, GSH peroxidasa y catalasa. Fueron capaces también de reducir significativamente los niveles de malondaldehído en el ensayo de la peroxidación lipídica *in vivo* (Zhang et al., 2014).

Polisacáridos (PAP), derivados de cuerpos fructíferos de *P. abalonus* fueron aislados y probadas sus potencialidades antiproliferativas en células LoVo de carcinoma colorrectal humano, demostrando actividad apoptótica dependiendo

de las dosis utilizadas. Demostró además una elevada actividad antioxidantes en modelos de ensayos *in vitro* (Ren et al., 2015).

Polisacáridos aislados de *P. eryngii* (PEPS) y exopolisacáridos de *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 (ST1275 EPS) fueron sulfatados con grados de sulfonación de 0.69 y 0.31, respectivamente. Proceso de sulfonación demostró aumentar significativamente la capacidad antioxidante de ambos polisacáridos. Sin embargo, los PEPS sulfatados presentaron mayor potencial antibacteriano comparado con los ST1275 EPS sulfatados (Li & Shah, 2014).

Complejos polisacárido-péptido, polisacáridos-proteína y polisacáridos de forma general han sido aislados de hongos comestibles, dentro de los que se destaca el género *Pleurotus*. Muchos de estos compuestos han sido evaluados con respecto a sus propiedades inmunomoduladoras, arrojando resultados promisorios en este sentido. Silveira et al., 2014, en un estudio realizado en cuerpos fructíferos de *P. sajor-caju*, lograron aislar un β (1-3)-D-glucano lineal, observándose un efecto inmunomodulador del mismo sobre macrófagos THP-1. De igual manera este β -D-glucano fue capaz de inhibir la fase de nociocepción inflamatoria, inducida por formalina a bajas dosis, además de la reducción del número de leucocitos totales y los niveles de mieloperoxidasas (MPO) inducidos por LPS. Otros estudios revelan a bifuncionalidad (inmunomoduladora-antimicrobiana) de una fracción polisacáridica de *Pleurotus* sp., la cual provocó la activación del sistema de autólisis de ocho cepas bacterianas y fúngicas. Además, dicha fracción a una concentración de 5-100 $\mu\text{g/ml}$ potenció la actividad de la fosfatasa ácida de macrófagos peritoneales en un modelo murino por 133-184% comparado con el control (Llauradó et al., 2015).

Varios autores evalúan de manera promisoriosa la posibilidad de utilizar hongos comestibles, específicamente el género *Pleurotus*, como posibles biofábricas para la producción y liberación de vacunas a bajo costo, tomando como premisa la riqueza en β -glucanos y sus propiedades inmunomoduladoras, que estas presentan. Esta idea incluye el hecho de que la biomasa comestible de estos organismos puede ser producida a bajos costos y en períodos de tiempo relativamente cortos. A esto se une la alta capacidad biosintética de

metabolitos inmunomoduladores, además de la facilidad y disponibilidad para su manipulación por métodos genéticos (Pérez-Martínez, Acevedo-Padilla, 2015).

Un novedoso polisacárido (PN-S) extraído a partir de *P. nebrodensis*, fue purificado y caracterizado, evaluando su actividad inmunoestimulante en macrófagos RAW264.7. Luego de la exposición al PN-S, la fagocitosis de los macrófagos mejoró significativamente. El tratamiento con este polisacárido potenció la producción de IL-6, óxido nítrico, interferón gamma y factor de necrosis tumoral (TNF- α). (Cui et al., 2015).

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en la planta de Investigación-Producción de Setas Comestibles, en el Laboratorio de Inmunología del CEBI (Universidad de Oriente), así como en el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de la Facultad de Farmacia, Ciencias Veterinarias y Biomédicas de la Universidad de Amberes, Bélgica.

2.1 Cepa utilizada y condiciones de cultivo

En el trabajo se utilizó la cepa de *Pleurotus* sp. CCEBI-3024, la cual pertenece a la Colección de Cultivos del CEBI. Para su propagación, la siembra se realizó en placas Petri, las cuales fueron encubadas a 37°C hasta lograr un crecimiento micelial total.

2.2 Obtención de los extractos hidrosolubles crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

El cultivo sumergido se desarrolló durante 15-20 días, en erlenmeyers de 1L de capacidad conteniendo 500 mL de medio YPG con la siguiente composición: glucosa (2%); peptona (0.5%); extracto de levadura (0.5%); KH_2PO_4 (0.1%); $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1%), pH 5. Se utilizó una zaranda (MIZARD, 2001) a 120 rpm. Una vez alcanzada una biomasa celular adecuada se filtró y el micelio resultante se lavó exhaustivamente con agua destilada.

Luego se procedió al secado en estufa de la biomasa colectada a 40°C durante 18h. Luego esta biomasa pasó a H_2O caliente entre 90°C - 95°C durante 4h en una proporción de 1:100 (w/w). Luego se dejó enfriar y se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. El precipitado de los polisacáridos se realizó a partir del sobrenadante, utilizando 4 volúmenes de etanol al 96%, seguido de una incubación durante toda la noche.

Seguidamente se procedió a la colecta del precipitado por centrifugación a 5000 r.p.m por 20 minutos y posterior lavado del pellet con etanol. Luego se procedió a pesar e pellet obtenido, el cual fue resuspendido en agua destilada para su posterior utilización en los ensayos.

Por otra parte, los cuerpos fructíferos se obtuvieron mediante fermentación en estado sólido (FES), utilizando como sustrato la pulpa de café, previamente pasteurizada, bajo las condiciones de cultivo referidas por Bermúdez et al.,2001.

Materiales y Métodos

La biomasa colectada se lavó y se secó en estufa 40°C durante 12h. La misma se utilizó en la decocción en agua caliente, según fue mencionado para el caso

del micelio. La precipitación de los polisacáridos se realizó de la misma forma descrita anteriormente. Luego se procedió a pesar el pellet obtenido y para resuspenderlo en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL para su posterior utilización.

2.3 Cuantificación de los componentes químicos mayoritarios de los extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus sp.*

2.3.1 Determinación de proteínas.

Para la determinación de proteínas de los crudos de polisacáridos de los extractos de *Pleurotus sp.*, se empleó el método de Lowry (1951). Las muestras fueron incubadas con el reactivo de *Lowry* durante 15 minutos. Este reactivo está compuesto por tres soluciones que se mezclan en el momento de su utilización y que son las siguientes:

A: Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M.

B: Sulfato cúprico al 1%.

C: Tartrato sódico-potásico al 2%.

En el momento de su uso, se mezclaron 50mL de A con 0.5 mL de B y 0.5 mL de C. Luego de pasados los 15 minutos, se les añadieron a las muestras 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejándose reposar por otros 30 minutos. Las absorbancias fueron medidas a 595 nm. Para la confección de la curva patrón ($y = 0,0018x + 0,0249$; $R^2 = 0,9927$), se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) con el empleo de un intervalo de concentraciones entre 5-200 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se expresaron como μg en equivalentes de BSA por mL del extracto y como g en equivalente de BSA por 100g del extracto en seco.

2.3.2 Determinación de carbohidratos totales

El ensayo se llevó a cabo por el método fenol-sulfúrico (Dubois 1956). Se mezclaron 2 mL de las muestras con 2 mL de fenol al 5% en tubos de ensayo y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se les añadieron 5 mL de H_2SO_4 , se dejaron reposar por 15 min y se determinó la

Materiales y Métodos

absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Se utilizó glucosa para la curva de calibración ($y = 0,0033x - 0,0408$; $R^2 = 0,995$) en concentraciones de 10-200 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se expresaron como μg en equivalentes de glucosa por

mL del extracto y como g en equivalente de glucosa por 100g del extracto en seco.

2.3.3 Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores de las muestras se realizó por el método de Miller (1959), utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para la preparación de dicho reactivo se disolvieron 0,8 g de NaOH en agua destilada, luego se adicionaron 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0,5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Esta mezcla se aforó a 50 mL con agua destilada y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C. Posteriormente se tomaron 0,5 mL de cada una de las muestras y 0,5 mL del reactivo DNS, se llevó a ebullición por 5 minutos e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. A las muestras se les adicionaron 5 mL de agua destilada, para luego proceder a su agitación y reposo por 15 min. La absorbancia se determinó a 540 nm. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada. Para el ensayo se utilizó una curva de calibración empleando la glucosa como estándar ($y = 0,0004x - 0,007$; $R^2 = 0,9942$), en concentraciones de 0.1-1 mg/mL. Los resultados se expresaron como μg en equivalentes de BSA por mL del extracto y como g en equivalente de BSA por 100g del extracto en seco.

2.3.4 Cuantificación de fenoles totales.

La determinación del contenido de polifenoles en los extractos de *Pleurotus* sp, se llevó a cabo según el procedimiento Slinkard y Siglenton, 1977. Se tomaron 250 μL de cada extracto. Se les añadió 250 μL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10%, dejándolos reaccionar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 250 μL de una solución saturada de Na_2CO_3 . Después de 1h de reposo en cuarto oscuro, se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro y se comparó con una curva de calibración realizada con ácido tánico; ($y= 0.0098x-0.1231$ ($R^2 =0.993$)). Los resultados fueron expresados como μg en equivalentes de ácido tánico por mL de los extractos y como g en equivalentes de ácido tánico por 100 g de los extractos.

2.4 Citotoxicidad de los extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus* sp.

2.4.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular J774 proveniente de la American Type Culture Collection (ATCC), mantenida en Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH) de la Universidad de Amberes, Bélgica. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos, transparentes de fondo liso, en medio DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's (Gibco® Life Technologies, Gent Belgium), suplementado con suero fetal bovino al 10% a 37 °C con un 5% de CO₂. El medio fue reemplazado tres veces en la semana hasta alcanzar la total confluencia de las células.

2.4.2 Citotoxicidad de los extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus* sp. por el método de la rezasurina

Para evaluar la toxicidad de los extractos de *Pleurotus* sp. frente a la línea celular mencionada, se comprobó primeramente el estado de las mismas, con previo subcultivo bajo microscopio invertido. Posteriormente, debido a la adherencia de las células, se raspó la superficie del frasco de cultivo con un raspador de células (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzer Land) y se resuspendió en medio DMEM fresco. Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pozos, transparentes de fondo liso.

Se tomaron 10 µL de células más medio y se contaron en la cámara contadora Kova® de 10 rejillas (Hycor Biomedical inc (Kassel- Lonfelden, Germany)). Se utilizó entonces una suspensión celular de concentración 5×10^5 células/mL, de la cual, fueron adicionados 100 µL en los pocillos desde B2-B11 hasta G2-G10, según se presenta en la figura 1. Posteriormente se incubaron las células en las placas de 96 pozos durante 24 horas a 37 °C en 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se removi6 el medio por inversión de la placa y se adicionaron 100 µL de medio DMEN fresco. Se dispensaron los extractos de *Pleurotus* sp en un rango de concentraciones de 128-0.5 µg/mL por triplicado, utilizando dos controles: control positivo que contiene células más medio y un control

negativo, solamente con medio de cultivo, a los cuales se le adicionó 200 μ L de DMEM. El tamoxifen (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) se utilizó como droga

de referencia en un rango de: 64 -0.5 µg/mL. Se incubaron nuevamente las placas durante 24 horas a 37 °C en 5% de CO₂ y la viabilidad celular, se evaluó a través del marcador redox, resazurina.

2.4.3 Viabilidad Celular

El ensayo de la resazurina fue utilizado para evaluar el efecto citotóxico de los extractos del crudo de polisacáridos de *Pleurotus* sp. Este es un ensayo colorimétrico, donde las células vivas convierten la forma azul oxidada resazurina en la forma rosada fluorescente resorufin. Solo las células viables son metabólicamente activas y producen NADH para inducir la conversión. Las células no viables rápidamente pierden la actividad metabólica y su capacidad de convertir la resazurina. Se adicionó 40 µL de resazurina (2,2 µg/mL) en cada pocillo, para luego incubar por 4 horas a 37°C en 5 % de CO₂ y medir la fluorescencia (550 nm de excitación y 590 nm de emisión) en un lector de microplacas, marca: GeNios, Tecan, Mechelen, Bélgica, utilizando el programa kopie Van X Fluor, versión: V4.5.

2.4.4 Citotoxicidad de los extractos de *Pleurotus* sp. por el método del rojo neutro.

Se utilizó el método del rojo neutro siguiendo el protocolo propuesto por Repetto et al., 2008, para evaluar la toxicidad de los extractos de *Pleurotus* sp. frente a la línea celular J774. Estableciendo los mismos pasos que los mencionados en el método anterior, se utilizan las placas de 96 pozos y la línea celular propuesta. En este método se utiliza una solución patrón de rojo neutro de 4 mgmL⁻¹, a partir de la cual se prepara el rojo *neutro medio* (1:100 de la solución patrón en medio DMEM) y una solución de rojo neutro indicador (10 mL de etanol 96 %, 10 mL de agua destilada y 0.2 mL de ácido acético glacial). El primer día, se incuban las células según concentración requerida con medio DMEM pero libre de suero fetal y se incuban 24 horas a 37 °C con un 5 % de CO₂. Al día siguiente se remueve el medio y se adiciona 100 µL de DMEM fresco, además de los extractos a las concentraciones de 128-0.5 µg/mL. Se

realiza entonces la segunda incubación por 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Al tercer día se remueve el medio y los extractos de las células y se adiciona

100 μ L de rojo *neutro medio*, para incubar durante dos horas. Posteriormente se observan las placas al microscopio invertido y se remueve la solución de rojo *neutro medio*. Las células son lavadas con 150 μ L de PBS y se adiciona 150 μ L de rojo *neutro indicador*. Se agitan las placas en zaranda por 10 minutos y luego se mide la densidad óptica a 540 nm en lector de microplacas Glomax Discover Promega. Las células viables incorporarán y fijarán el colorante vital del rojo neutro.

Los resultados fueron procesados utilizando el programa de determinación de las IC₅₀, elaborado por el LMPH, situado en el servidor:lmph-all, el cual incluye los programas IC₅₀V20, Raw data e IC- Tool VO2.

2.5 Evaluación antibacteriana y antifúngica de los extractos de *Pleurotus* sp.

La evaluación antibacteriana y antifúngica se realizó a través del método de dilución, donde se mezclaron los extractos de *Pleurotus* sp. con el medio adecuado donde previamente se inoculó el microorganismo a evaluar.

Los microorganismos utilizados para el caso de la evaluación antibacteriana fueron: *Escherichia coli* (*E. coli* ATTC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* ATTC 9027, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATTC 6538) y para la antifúngica, *Candida albicans* (*B 63195*).

En todos los casos, mantenidos en cryoviales en freezer de -80 del Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de la Universidad de Amberes, Bélgica.

En el caso de la actividad antibacteriana, se utilizó como medio de cultivo, el caldo Muller Hinton. Las bacterias fueron sembradas a una concentración de inóculo de 10⁵ CPU/mL (Hadacek y Greger, 2000), proveniente de un patrón conservado en biofreeze. Posteriormente se dispensó 100 μ L de caldo Muller Hinton, 100 μ L de los extractos a las concentraciones (128 μ g/mL-0.5 μ g/mL) y 100 μ L de la suspensión bacteriana, los experimentos se realizaron por triplicado. Además, se incluyeron los controles positivos y negativos, así como las drogas de referencia para cada tipo de bacteria, según se muestra en la figura 2. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Pasado este

Materiales y Métodos

tiempo, se adicionaron 20 μL de resazurina como indicador redox y se esperaron de 20-30 minutos para la lectura de la fluorescencia (550 nm de

excitación y 590 nm de emisión) en lector de microplaca marca: GeNios, Tecan, Mechelen, Bélgica, utilizando el programa kopie Van X Fluor, versión: V4.5.

Por su parte, para la evaluación de la actividad antifúngica se utilizó el mismo método mencionado anteriormente, pero utilizando como medio de cultivo el RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium). Con el mismo diseño anterior y con las drogas de referencia para *Candida albicans*, se incubaron las placas durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 10 µL de resazurina y se esperaron cuatro horas hasta la lectura de la fluorescencia en lector de microplaca marca: GeNios, Tecan, Mechelen, Bélgica.

Los resultados fueron procesados utilizando el programa de determinación de las IC₅₀, elaborado por el LMPH, situado en el servidor:Imph-all, el cual incluye los programas IC50V20, Raw data e IC- Tool VO2.

2.6 Evaluación de la genotoxicidad de los extractos de *Pleurotus sp*

La evaluación de la genotoxicidad fue realizada como se describe en Verschaeve et al. (1999) con el ensayo de Vitotox™. Este ensayo se basa en una bacteria recombinante *Salmonella typhimurium*, cepa (TA 104 recN2), la cual contiene un operón lux de *Vibrio fischeri* bajo el control transcripcional del gen recN, el cual forma parte del sistema SOS. En el caso de daño al ADN de la cepa TA 104 recN2-4 (Genox), causada por la presencia de un compuesto genotóxico, la respuesta del sistema SOS es activada al igual que el gen luciferasa.

La actividad luciferasa es medida por emisión de luz y depende de la genotoxicidad del compuesto evaluado. La relación señal/ ruido representa la producción de luz de las células expuestas dividido por la producción de luz de las células no expuestas. La respuesta medida puede además compararse con una obtenida en presencia de una bacteria constitutiva productora de luz (TA 104 pr1, Cyttox) con un operón bajo el control del promotor constitutivo pr1 y en el cual la producción de luz no está influida por compuestos genotóxicos. La respuesta dosis dependiente de luz producida por TA 104 recN2-4 dividida por la luz producida por TA 104 pr1 superior a 1.5 indica mutagenicidad de la

muestra. El producto evaluado es considerado genotóxico cuando la relación Genox/Cytox es mayor que 1.5 y la correlación dosis respuesta supera a un

rango de concentración de al menos de las tres diluciones utilizadas. Como controles positivos se utilizaron el 4- nitroquinolina-N-oxido en ausencia de la fracción metabólica hepática de rata (S9), mientras que el benzo[a] pireno fue utilizado en presencia de S9. Los análisis en presencia del extracto hepático S9 se llevaron a cabo como se describe en Verschaeve et al., (1999) para imitar la transformación del hígado.

Se utilizó una solución patrón de ampicilina de 8 mg/mL, así como una de tetraciclina de 0.8 mg/mL. Ambas conservadas a 4 °C.

Del mismo modo se empleó un medio rico cuya composición era: caldo LB (caldo de lisogenia o Lennox), glucosa y CaCl; así como un medio pobre con composición: caldo LB, glucosa y CaCl, NaCl.

Como controles positivos, se incluyeron una solución de trabajo de 4-nitroquinolina-N-oxide (4NQO) de concentración 0.4 µg/mL y una de Benzo(a) pireno (0.8 mg/mL). Las cepas bacterianas fueron: *Salmonella typhimurium* (TA104 Rec N2-4) y (TA104 pr1), depositadas en el laboratorio LMPH.

El primer día, se tomaron dos erlenmeyers estériles de 50 mL con sus tapas y se designaron, uno como Genox y otro como Cyttox. A cada erlenmeyers se le adicionó 24 mL de medio rico, 625 µL de la solución patrón de tetraciclina, 312.5 µL de la solución patrón de ampicilina y 100 µL de la suspensión bacteriana a partir del criocultivo descongelado, se mezcló todo y se sellaron los erlenmeyers para ser incubados en zaranda por 16 horas, con una velocidad de 170-300 rpm a 36 ± 1 °C.

El segundo día, se marcaron dos nuevos erlenmeyers: Cyttox y Genox y se adicionó a cada uno 20 mL de medio pobre y 1 mL del correspondiente cultivo de las cepas bacterianas que estuvieron toda la noche en agitación, se mezcló todo y se sellaron los erlenmeyers, los cuales estuvieron en zaranda durante 1 hora bajo las mismas condiciones de trabajo mencionadas con anterioridad.

Para la preparación de las diluciones en serie de las muestras evaluadas y los controles, se utilizó una placa de 96 pozos transparente, de fondo liso. Las concentraciones de los extractos del crudo de polisacárido del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp fueron: 1, 0.5 y 0.25 mg/mL. El diseño utilizado se muestra en la figura 3.

Materiales y Métodos

Los pocillos A, B, C y D se utilizaron para preparar las diluciones de las sustancias evaluadas con solventes, mientras que los pocillos E F G H fueron

utilizados para realizar diluciones de las sustancias en agua y preparar los controles. Al contenido de los pocillos E F G H se añadió a la bacteria en una placa negra de 96 pocillos estéril.

A partir de un extracto metabólico S9 (extracto hepático de rata), se preparó S9 mixto, adicionando 53 µl S9 a 1.1 mL del reactivo AB y 1mL de medio pobre. Con la suspensión bacteriana, se prepararon cuatro soluciones: Genox, Genox + S9, Cytox y Cytox + S9. Cada uno de los siguientes volúmenes: 10 µl de las diluciones seriadas de las muestras evaluadas y controles y 90 µL de la suspensión bacteriana de cada tipo, fueron transferidos a una placa de 96 pozos de color negro, estéril, como se muestra en la figura 4.

Finalmente, las placas fueron leídas en un luminómetro marca: Glomax Discover Promega, con los siguientes parámetros: 48 ciclos con un intervalo de 5 minutos y luminiscencia con 1 segundo por pocillo como tiempo de integración.

2.7 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus* sp.

2.7.1 Determinación de la Capacidad Antioxidante Total (CAT) por el método fosfomolibdico.

La capacidad antioxidante total de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. se evaluó por el método fosfomolibdico, descrito por Prieto y col., 1999.

Se preparó una solución reactivo que contiene ácido sulfúrico 0.6M, hidrógeno fosfato de sodio 28mM, molibdato de amonio 4mM, todo esto disuelto en 100mL de agua destilada. Se toman 100µL del extracto a lo que se le añade 1mL de la solución reactivo. Se procede a incubar 90 min a 95°C en baño maría. Se deja enfriar y la absorbancia es medida a 695nm.

Se midió la CAT de las muestras a una concentración de 16 µg/mL. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de calibración preparada con ácido ascórbico ($y=0,008x - 0,0152$; $R^2 = 0,9913$; 5-100 µmol/mL). Las determinaciones se hicieron por triplicado y los resultados obtenidos se

expresaron como μmol equivalentes de ácido ascórbico por mg de sólidos totales (μmol EAA/mg), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CAT} = \text{LIC} (\mu\text{mol} / \text{mL}) \times \text{VTE} (\text{mL}) / \text{Sólidos totales} (\text{mg})$$

Donde:

CAT: Capacidad Antioxidante Total (μmol EAA/mg)

LIC: Lectura Interpolada en la Curva de calibración

VTE: Volumen Total de Extracto

2.7.2 Determinación del Poder Reductor.

El poder reductor se determinó por la técnica referida por Huang y Mau., 2006, con cuatro concentraciones de los extractos evaluados. A 2,5 mL de las muestras se le añadió 2,5 mL de ferricianuro de potasio (10 g/mL). Se incubó durante 20 min a 50°C y una vez frescas las muestras, se añadió 2,5 mL de ácido tricloroacético (100g/mL). A continuación, se procedió a centrifugar a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se tomaron 5 mL del sobrenadante al cual se le añadieron 5 mL de agua destilada y 1 mL de cloruro férrico (1 g/L). Luego se pasó a leer a 700 nm contra un blanco preparado con agua destilada. El poder reductor se expresó como la concentración de los extractos a los que se alcanza el 50% de la absorbancia máxima (EC_{50}) (Barros et al., 2007).

2.8 Análisis estadístico.

Todos los resultados fueron expresados como la Media \pm SD para tres réplicas de las muestras (n=3). Para la cuantificación de los componentes químicos mayoritarios en las muestras, además de las evaluaciones de la capacidad antioxidante de los extractos se utilizó el test de la T de Student para un nivel de significación de $p < 0,05$. En el caso de no presentarse una distribución normal de los datos se empleó su variante no paramétrica, U de Mann Whitney. Se utilizó en el procesamiento de los datos el software profesional SPSS v.20.

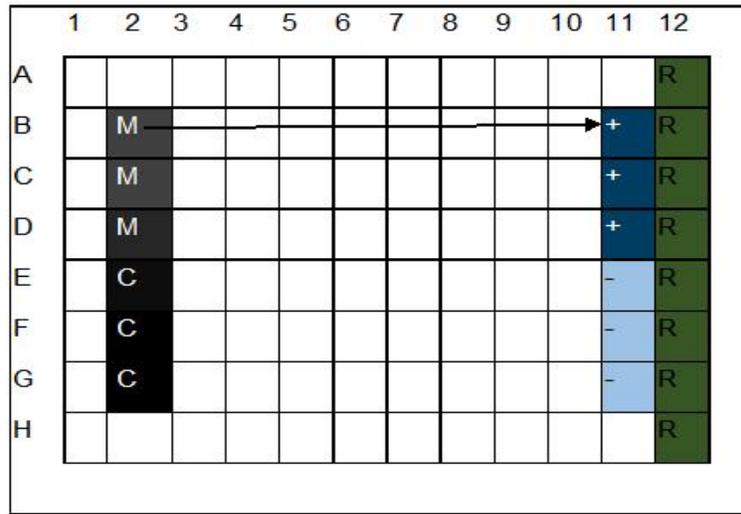


Figura 1. Esquema del diseño para evaluación de la citotoxicidad de extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp en placas de 96 pozos, transparentes de fondo liso. R. Droga de referencia: Tamoxifen (64-0,5 µg/mL); - control negativo; + control positivo; M extracto de un crudo de polisacáridos del micelio de *Pleurotus* sp; C extracto de un crudo de polisacáridos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

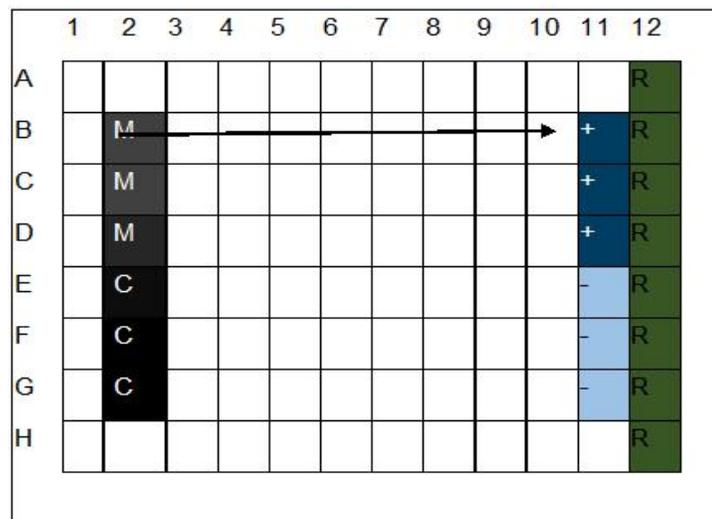


Figura 2. Esquema del diseño de la evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos de un crudo de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp en placas de 96 pozos, transparentes de fondo liso. R. Droga de referencia: (*S. aureus*: eritromicina; 0,5-64 µg/mL; *E.coli*: Ampicillina, 0,5-64 µg/mL; *P. aeruginosa*: cloranfenicol, 0,5-64 µg/mL; *C. albicans*: Anfotericina B: 0,25-0,03 µg/mL); - control negativo; + control positivo; M extracto de un crudo de polisacáridos del micelio de *Pleurotus* sp; C extracto de un crudo de polisacáridos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

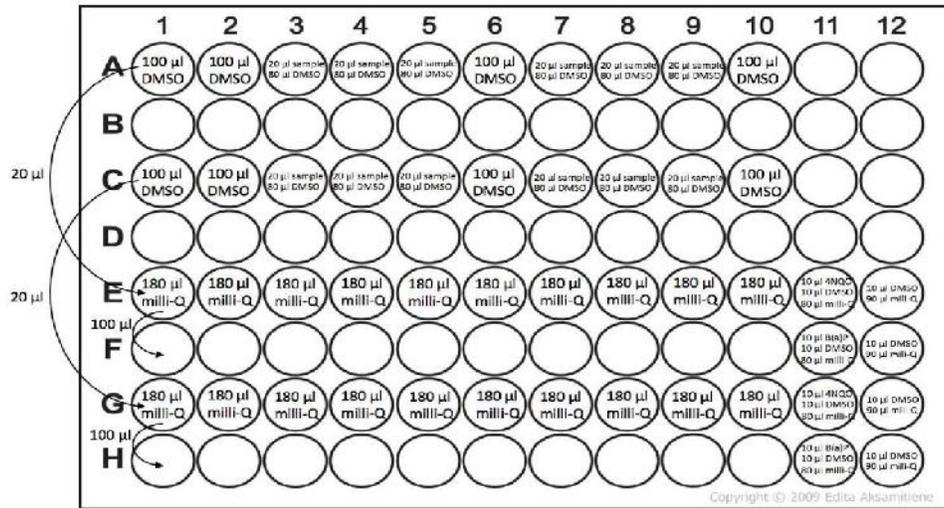


Figura 3. Esquema del diseño en placas de 96 pozos, transparentes de fondo liso para preparación de las diluciones de las sustancias y extractos evaluados para el ensayo de Vitotox™.

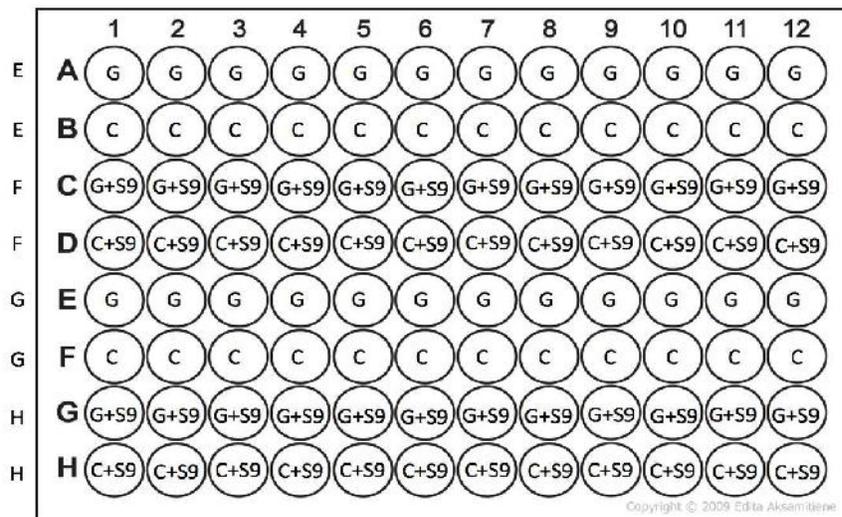


Figura 4. Esquema del diseño en placas de 96 pozos de color negro, para preparación de las diluciones de las sustancias y extractos evaluados para el ensayo de Vitotox™.

CAPÍTULO 3.
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

3.1 Cuantificación de los componentes químicos mayoritarios de los extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus* sp.

3.1.1 Cuantificación de proteínas

Los análisis del contenido de proteínas en extractos polisacáridicos de hongos obtenidos por extracción acuosa y otros procedimientos, han confirmado la presencia de estos componentes en cantidades variables. Incluso con el tratamiento térmico de estos extractos, no se logra la desproteínización completa de los polisacáridos.

En el presente estudio se obtuvieron valores similares respecto al contenido proteico para ambos extractos (tabla 1), siendo ligeramente superior en el caso del crudo de polisacáridos de cuerpos fructíferos con $160.24 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ ($16.02 \pm 0.12 \text{ g/100g}$). Este resultado también supera ligeramente al obtenido por Mitra et al., 2013 para un valor de 15.7 g/100g en *Pleurotus ostreatus*; mostrándose además superior en orden decreciente en comparación con determinaciones proteicas realizadas en otros ejemplares fúngicos: $16.02 \text{ g/100g} > \textit{Agaricus brasiliensis}$ (7.3%) $> \textit{Phellinus linteus}$ (5.7%) $> \textit{Ganoderma lucidum}$ (2.6%) $> \textit{Agaricus bisporus}$ (0.9%) (Kozarski et al., 2011).

Muchos estudios han postulado que, la presencia de proteínas o péptidos como parte de la estructura de polisacáridos, es responsable en parte, del potencial de barrido de radicales de estas moléculas. En este sentido, un estudio realizado por Liu et al., 2013, plantean la habilidad de barrido de radicales superóxido e hidroxilo con relación a la cantidad de proteínas (péptidos) presentes en complejos polisacáridos-proteínas; demostrándose que en aquellas muestras polisacáridicas donde las concentraciones de proteínas son casi nulas (trazas), la actividad antioxidante es muy baja, no así en aquellas muestras proteicamente enriquecidas. Por consiguiente, el contenido de compuestos conjugados de proteínas y fenoles presentes en extractos de polisacáridos pueden ayudar a explicar el elevado potencial antioxidante que estos compuestos presentan.

3.1.2 Cuantificación de carbohidratos

Resultados y Discusión

Los carbohidratos constituyen los componentes prevalecientes de la materia seca de los hongos comestibles, alrededor de un 50-60%. Los carbohidratos

están formados por varias unidades monosacáridas, sus derivados y oligosacáridos (comúnmente llamados azúcares), además de los polisacáridos, compuestos constituidos por más de diez unidades monosacáridas.

En nuestro estudio se determinó el contenido de carbohidratos totales de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos; 57.93 ± 10.42 y 32 ± 6.8 g/100g respectivamente (tabla 2). Los datos disponibles de *Lentinus edodes* muestran para un crudo de endopolisacáridos derivados de su masa micelial, un total de carbohidratos de 22.8 g/100g. De igual forma, el valor obtenido de las muestras de cuerpos fructíferos de *Lentinus polychrous* con respecto a la cantidad de carbohidratos totales (45.9 g/100g), no supera al valor alcanzado por nuestro estudio (Wasser, 2010). Es válido aclarar que el contenido total de carbohidratos de las setas, incluyendo hidratos de carbonos digeribles y no digeribles, varía con la especie desde un 35-70% del peso seco (Díez y Alvarez, 2001; Mau et al., 2001). Se ha comprobado además que el sustrato utilizado para los cultivos de los hongos juega un papel primordial en su riqueza metabólica, dentro de los que se destacan los carbohidratos (García 1999). Dentro del reino fungi, las especies de *Pleurotus* pueden crecer sobre una amplia variedad de sustratos y tienen especiales propiedades para degradar los componentes lignocelulósicos presentes, en mayor proporción en los residuos de la agroindustria. Nieto et al., 2008 demostraron que en cuanto a la especie, la variación es mayor para el *P. ostreatus* que para el *P. Pulmonarius* y *P. sajor-cajú*. Este comportamiento pone de manifiesto que la cantidad de carbohidratos está relacionada tanto con el sustrato como con la especie.

A pesar de que en nuestro estudio el análisis estadístico utilizado no arrojó diferencias significativas en cuanto a las concentraciones de carbohidratos totales entre los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpo fructíferos; es oportuno decir que estas diferencias cuantitativas, comunes en extractos de setas comestibles, dependerán en muchos de los casos de la variedad de géneros y especies utilizadas en los estudios, cualidades de los sustratos utilizados, así como del proceso biotecnológico empleado (Gregori et

Resultados y Discusión

al., 2007; da Silva et al., 2011). Llauradó 2016, determinó para extractos hidrosolubles de cuerpos fructíferos y micelio de *Pleurotus sp.* un total de

carbohidratos del 36% y 70% respectivamente. La fase micelial constituye una etapa temprana en el crecimiento y desarrollo de los basidiomicetos, la cual presenta particularidades en cuanto a requerimientos nutricionales, además de una acumulación importante de diversos metabolitos y otros precursores de biomoléculas importantes en posteriores etapas de desarrollo y funciones fisiológicas específicas (Lau et al., 2013).

3.1.3 Cuantificación de azúcares reductores

Los azúcares reductores son aquellos que poseen un grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas. Todos los monosacáridos son azúcares reductores ya que al menos tiene un $-OH$ hemiacetalico libre. Los monosacáridos son los lementos más sencillos, a partir de los cuales se forman las moléculas más complejas dentro de los glúcidos. Los extractos de polisacáridos contienen glucosa como el componente monosacarídico prevaleciente de la cadena principal y en una proporción variable con respecto a otros azúcares (Klaus et al, 2011). De igual forma otras moléculas de azúcar pueden encontrarse unidas lateralmente a polisacáridos como β -D-glucanos, tales como manosa, xilosa, galactosa (Wasser, 2002). La habilidad de barrido de radicales libres por parte de los polisacaridos puede estar condicionado por la presencia de hidrógenos en formas específicas, además de unidades monosacáridicas y de la ubicación de enlaces externos con respecto a la cadena principal. Es así como existe una conexión entre la composición monosacarídica, las conformaciones de cadenas laterales y la habilidad de captación de radicales DPPH de polisacáridos derivados de *L. edodes* obtenidos por cultivo sumergido. Este estudio detectó que la presencia de unidades de glucopiranosas unidas por enlaces del tipo β -(1,6)-glicosídico y unidades de arabinosa por enlaces (1,4) en las cadenas laterales, tiene un significado importante en la catación de radicales libres en comparación con el ácido ascórbico, BHA y ácido cítrico (Lo et al., 2011).

En nuestro estudio, utilizando el método de Miller (1959) y bajo las condiciones experimentales utilizadas, solo se detectaron azúcares reductores en el

Resultados y Discusión

extracto de micelio (4.85 ± 2.3 g/100g) (Tabla 2). Es válido aclarar que la no detección de azúcares reductores en el extracto de cuerpos fructíferos, no

descarta la presencia de los mismos en la mezcla ya que estos podrían encontrarse a muy bajas concentraciones y de esta forma escapar de la sensibilidad del método para su cuantificación. Es oportuno agregar también, que los mayores valores obtenidos de estos metabolitos generalmente son alcanzados después de desproteínizar y fraccionar los polisacáridos crudos por técnicas cromatográficas y otras (Xia et al., 2011).

3.1.4 Cuantificación de fenoles totales

Especial atención han tenido los hongos Basidiomicetes, los cuales han sido evaluados por sus propiedades nutricionales y farmacológicas. En este sentido, los polisacáridos fúngicos han sido propuestos como un factor promisorio para varias aplicaciones industriales incluyendo la biofarmacia y la cosmetología. Los polisacáridos de setas más abundantes son, quitina, alfa y beta glucanos, xilanos, mananos y galactanos (Zhang et al., 2007).

Muchos polisacáridos obtenidos a partir de *Lentinus polychrous*, *Ganoderma atrum*, *Grifola frondosa* y *Lentinus edodes* se han reportado no solo por su actividad antioxidante, sino también porque ellos se consideran ingredientes bioactivos, involucrados en procesos inflamatorios y antitumorales (Wu y Hansen, 2008; Thetsrimuang et al., 2011). Investigaciones recientes de extractos polisacáridicos de hongos superiores obtenidos por diferentes vías, entre la que se destaca, extracción por agua caliente, refieren la presencia de compuestos fenólicos en estas muestras. Se ha demostrado una correlación positiva entre la intensidad del color de los extractos con la presencia de fenoles totales, asociado a su vez con un aumento de la actividad antioxidante (Heleno et al., 2012).

En nuestro trabajo se determinó el contenido de fenoles totales presentes en extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp, resultados que se presentan en la tabla 1.

Álvarez (2009) informó los metabolitos secundarios de mayor importancia farmacológica presentes en extractos hidrosolubles crudos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. CCEBI-3024. A pesar de que el tamizaje

Resultados y Discusión

fitoquímico ofrece información cualitativa, permite identificar los tipos de sustancias mayoritarias presentes en los extractos, representando esta

información un antecedente para la realización de estudios químicos más profundos.

Para este ensayo se utilizó la siguiente curva de calibración: $y = 0.0098x - 0.1231$ ($R^2 = 0.993$) para los fenoles totales expresados como ácido tánico. Los resultados muestran una importante concentración de compuestos fenólicos en las muestras (5.95 ± 0.3 g/100g para micelio y 4.36 ± 0.06 g/100g para cuerpo fructífero), con valores cercanos en cada caso y esencialmente similar al obtenido por Mitra (2013) en un extracto crudo de polisacáridos derivados de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (4.5 ± 0.3 g/100g) en condiciones similares y utilizando como patrón ácido gálico. Por su parte Thetsrimuang et al., 2011, reportaron un 58.4 mg/g de contenido de fenoles en un crudo de polisacáridos del micelio de *Lentinus polychrous*. Los tipos y cantidades de compuestos fenólicos pueden variar con las mismas condiciones de las especies (Vamanu et al., 2014). La composición específica y característica de cada seta puede estar asociado con los factores ambientales y condiciones de cultivo.

Se ha demostrado que los polisacáridos de origen natural no siempre existen de manera aislada, sino formando complejos con otros componentes moleculares dentro de los que se encuentran los fenoles. La formación de conjugados polisacáridos-polifenoles podría estar mediada por enlaces $-H$ o interacciones hidrofóbicas (Li et al., 2007). Estudios al respecto, corroboran que tales residuos moleculares, poseen una potente función antioxidante, demostrándose una elevada correlación entre la capacidad reductora de extractos acuosos de polisacáridos y el contenido fenólico. (Helena et al., 2012).

3.1.5 Cuantificación de polisacáridos totales

En el presente estudio la determinación de los polisacáridos totales se llevó a cabo por la sustracción de la concentración de azúcares reductores del total de carbohidatos cuantificados en las muestras. En el caso del extracto de cuerpos fructíferos se asumió como concentración de polisacáridos totales el valor obtenido en la determinación de carbohidatos totales, dada la no detección de

Resultados y Discusión

azúcares reductores en el extracto. Los valores obtenidos en este estudio (Tabla 2), para los polisacáridos totales, 53 ± 2.3 g/100g para el extracto de

micelio y 32 ± 6.8 g/100g para el extracto de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., constituyen valores cercanos a los referidos por Mitra, 2013, (43.9 ± 1.2 g/100g) para polisacáridos del tipo β -glucanos en un extrato crudo de polisacáridos derivados de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*. La literatura también reporta valores similares concentración para polisacáridos del tipo glucanos en otros ejemplares: *Ganoderma applanatum* (22.4%), *Ganoderma lucidum* (36.3%), *Lentinus edodes* (42.6%), *Agaricus brasiliensis* (40.1%), *Ganoderma lucidum* (20.8%) y *Phellinus linteus* (24.5%) (Griensven et al., 2012; Kozarski et al., 2011). Jaszek et al., 2013 en un estudio realizado de un extracto crudo de polisacáridos derivados del micelio de *Cerrena unicolor*, obtuvieron un valor inferior referente a la concentración de polisacáridos totales (73.2 mg/g).

Llauradó (2016) indentificó, para extractos acuosos de micelio y en una preparación seca pulverizada de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. CCEBI-3024, la presencia de moléculas presumiblemente del tipo β -glucanos y α -1,3-1,6-glucanos, utilizando para ello un método de análisis de transición conformacional. Este estudio marca un precedente en cuanto al conocimiento de los tipos de estructuras polisacáridicas presentes en los extractos crudos de polisacáridos de la cepa en cuestión empleada en este estudio. Todos estos conocimientos podrían fundamentar las potencialidades de estos extractos respecto a sus capacidades antioxidantes y antimicrobianas (Zhang et al., 2014; Li & Shah, 2014).

Resultados y Discusión

Tabla 1. Contenido de proteínas y fenoles totales de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos.

Extracto	Proteínas		Fenoles totales	
	µg/mL	g/100g	µg/mL	g/100g
Extracto micelial	147.97±6.6 ^a	14.79±0.66	59.55±3.83 ^a	5.95±0.3
Extracto cuerpos fructíferos	160.24±1.2 ^a	16.02±0.12	43.66±0.69 ^a	4.36±0.06

(^a) letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba MW-U (p 0.05). Media ±SD de tres experimentos (n=3).

Tabla 2. Contenido de carbohidratos, azúcares reductores y polisacáridos totales de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos

Extracto	Carbohidratos totales		Azúcares reductores		Polisacáridos totales	
	µg/mL	g/100g	µg/mL	g/100g	µg/mL	g/100g
Extracto micelial	579.33±104.28 ^a	57.93±10.42	48.58±23.62	4.85±2.3	530.75±104.28 ^a	53±2.3
Extracto cuerpos fructíferos	320.14±68.3 ^a	32±6.8	-	-	320.14±68.3 ^a	32±6.8

(^a) letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba MW-U (p 0.05). Media ±SD de tres experimentos (n=3).

3.2 Citotoxicidad y actividad antimicrobiana de los extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus* sp.

La citotoxicidad en determinadas líneas celulares es un importante criterio para asignar la selectividad de la actividad farmacológica de un producto determinado.

En este sentido, en nuestro trabajo se utilizaron dos métodos para su evaluación. Uno de ellos fue con el Alamar blue o rezasurina, aprovechando las ventajas que esta ofrece al mostrar gran sensibilidad utilizando propiedades fluorescentes.

El otro método, fue con el rojo neutro (3-Amino-7-dimetilamino-2-metil-fenazino hidrocloreto), que permite evaluar la toxicidad de un compuesto determinado, por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular. El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior.

Para ambos casos, los resultados obtenidos en nuestro estudio, utilizando la línea celular de macrófagos murinos J774 y con varias concentraciones de los extractos de *Pleurotus* sp, sugieren efectos no tóxicos en las células, según se muestra en la Tabla 3.

Es recomendable incluir una evaluación antimicrobiana paralela a la citotóxica (Maes et al., 2004) cuando se exploran las potencialidades farmacológicas de productos naturales como es el caso de los extractos derivados de *Pleurotus* sp. Existe un gran interés en restringir los aditivos alimenticios antimicrobianos sintéticos y desarrollar la aplicación de antimicrobianos a partir de productos naturales (Bassolé y Juliani, 2012).

En este sentido, las setas comestibles constituyen una valiosa fuente para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos (Ramesh et al., 2010; Gezer et al., 2006; Mercan et al., 2006). Se ha encontrado que diferentes especies de hongos muestran diferentes actividades antimicrobianas. Estas diferencias, son

Resultados y Discusión

probablemente una consecuencia de la presencia de diferentes componentes con dicha actividad.

En nuestro estudio se incluyeron bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como levaduras para llevar a cabo este objetivo. Según se muestra en la tabla 3 mencionada anteriormente, los resultados sugieren que no existe actividad antibacteriana ni antifúngica con las concentraciones evaluadas de los extractos de *Pleurotus* sp, esto puede estar relacionado con el hecho de que la intensidad del efecto antibacteriano depende de las especies de setas, las concentraciones de los extractos y los microorganismos evaluados (Kosani et al., 2012).

Por otro lado, a pesar de que es significativa la capacidad anticancerígena y antioxidante de numerosas especies de *Pleurotus*, su actividad antifúngica es insignificante (Cushnie and Lamb, 2005; Li et al., 2008). La actividad antifúngica en algunos extractos de setas comestibles es debido a la presencia de flavonoides, los cuales inhiben la germinación de esporas micromicetes, como fue demostrado en *Candida* spp., *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* y *P. italicum* (Cushnie y Lamb, 2005).

En este sentido, los polisacáridos de setas comestibles han sido reportados como estimuladores o supresores de componentes específicos del sistema inmune, siendo útiles en la terapia convencional del cáncer y de otras enfermedades (Wasser, 2002). Jaszek et al., 2013 evaluaron un crudo de polisacáridos de micelio de *C. unicolor* frente a *E coli* y *S aureus*, observando solo actividad antibacteriana contra *S aureus*, lo cual sugiere que esta fracción puede ser una fuente natural de agentes bacteriostáticos.

Ramesh y Pattar, 2010, estudiaron el perfil antimicrobiano de seis setas comestibles salvajes de la India, incluyendo *Pleurotus pulmonarius* frente a un panel de bacterias y hongos patógenos, lo cual indicó que los componentes bioactivos presentes en estas especies, influyen directamente en la capacidad antimicrobiana del hongo.

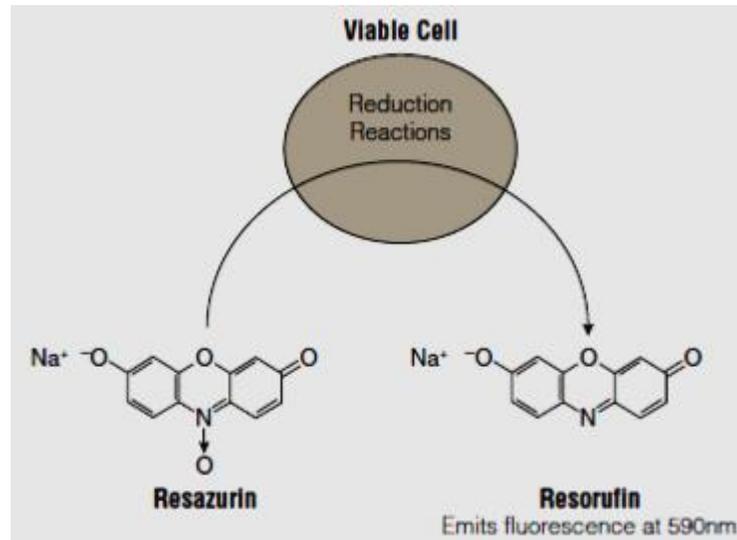


Figura 5. Conversión de resazurina a resorufin por células viables, resultando en un producto fluorescente. La producción de fluorescencia es proporcional al número viable de células. Tomado de Protocols and Applications Guide. www.promeqa.com. Rev. 3/11.

Tabla 3. Valores para la citotoxicidad en macrófagos murinos J774 y actividad antimicrobiana y antiúngica de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp

Extractos	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	SI Resazurina y rojo neutro
M	P. aeruginosa	>128	>128	>128
	S. aureus	>128		
	E. coli	>128		
	C. albicans	>128		
C	P. aeruginosa	>128	>128	>128
	S. aureus	>128		
	E. coli	>128		
	C. albicans	>128		
	S. aureus	>128		
	E. coli	>128		
	C. albicans	>128		

3.3 Evaluación de la genotoxicidad de los extractos de *Pleurotus* sp.

El ensayo fue evaluado en 4 horas, basado en la respuesta SOS dependiente de la producción de luz por la bacteria genéticamente modificada *Salmonella typhimurium*. Los valores de la relación señal/ruido (S/N) de la cepa (TA 104 pr1: Cyttox) y (TA 104 recN2: Genox) con los extractos del crudo de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp, no excedieron el rango establecido para considerarlos como genotóxicos y citotóxicos (> 1.5), respectivamente, tal como se muestra en las figuras (2; 3; 4 y 5).

En presencia de S9, los valores de la relación señal/ruido de las dos cepas Cyttox y Genox para ambos extractos también estuvieron por debajo de 1.5, lo cual indica que no hubo efecto genotóxico en las condiciones de imitación de la biotransformación del microsoma de hígado. Ninguno de los extractos estudiados presenta caracteres mutagénicos antes o después de la biotransformación.

Estudios similares fueron obtenidos por Vanhulle et al., 2008 en la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad de diferentes especies de hongos de pudrición blanca (*Coriolopsis polyzona*, *Perenniporia tephropora*, *Perenniporia ochroleuca*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor* y *Clitocybula dusenii*) durante la decolorización de colorantes.

Otros autores como Trinh et al., 2010, utilizando el ensayo de Vitotox, evaluaron la genotoxicidad de diferentes tipos de aguas tratadas en la germinación y crecimiento de semillas con diferentes propósitos, probando que las mismas no poseen riesgo para la salud humana.

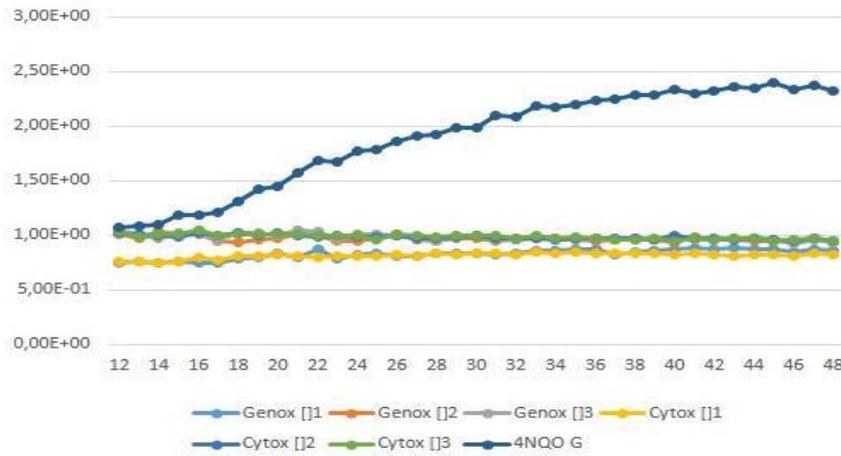


Figura 6. Resultados del test VITOTOX® para el extracto del crudo de polisácaridos del micelio en ausencia de S9.

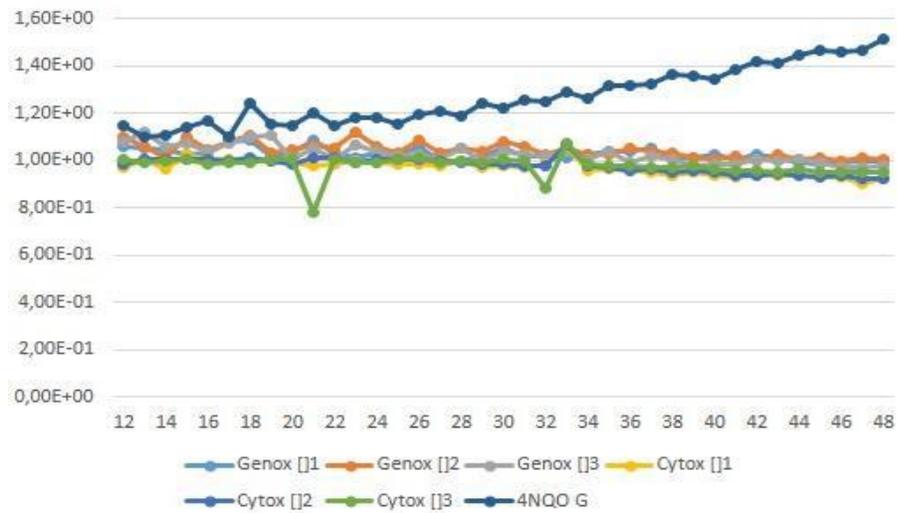


Figura 7. Resultados del test VITOTOX® para el extracto del crudo de polisácaridos del micelio en presencia de S9.

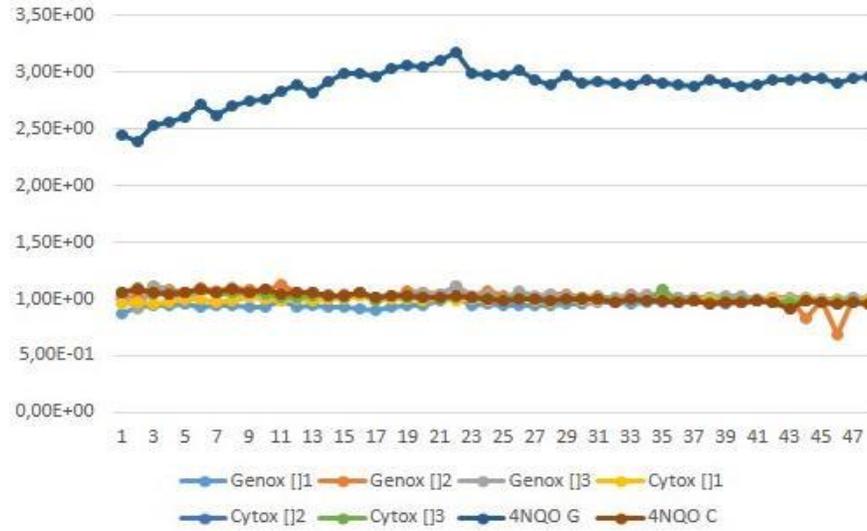


Figura 8. Resultados del test VITOTOX® para el extracto del crudo de polisacáridos de cuerpos fructíferos en ausencia de S9.

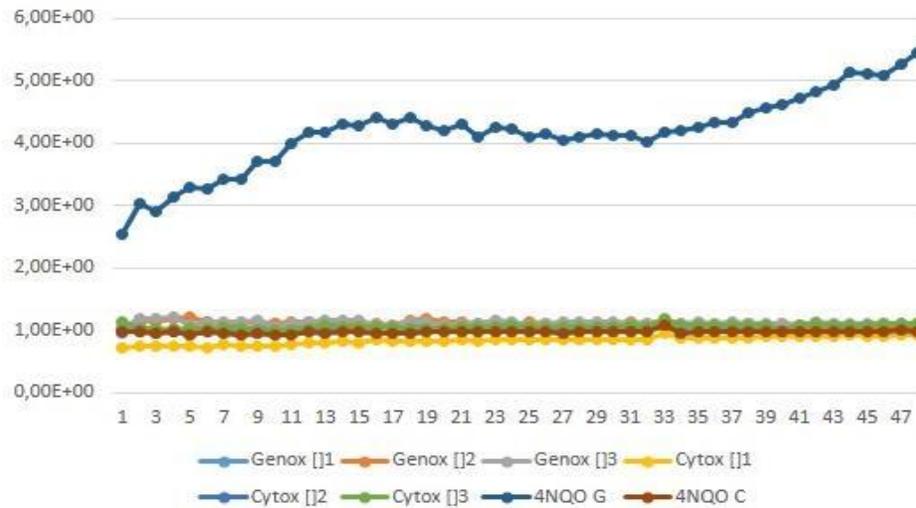


Figura 9. Resultados del test VITOTOX® para el extracto del crudo de polisacáridos de cuerpos fructíferos en presencia de S9

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo representan el primer acercamiento a la evaluación de la genotoxicidad de extractos obtenidos de *Pleurotus* sp, contribuyendo de esta manera a profundizar en la inocuidad de estos compuestos con potencialidades de aplicación en el diseño de suplementos dietéticos y otras formulaciones, orientadas al mejoramiento de la salud humana.

3.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos de *Pleurotus* sp.

3.4.1 Determinación del poder reductor

El método del poder reductor se basa en la capacidad de la sustancia que será evaluada de reducir las especies férricas (Fe^{3+}) a ferrosas (Fe^{2+}) por una transferencia electrónica directa. Este ensayo se presenta en la literatura en dos variantes: la conocida como FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) y la conocida como Reduction Power que es la empleada en nuestro trabajo, diferenciándose una de otra principalmente en la fuente de Fe^{3+} que se adiciona al sistema.

En este experimento, se realizó una medición espectrofotométrica a 700 nm, longitud de onda donde absorbe el complejo de Fe^{2+} formado. El incremento de la absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de Fe^{3+} reducido a Fe^{2+} por la especie antioxidante evaluada. Se refirió el poder reductor como la concentración del extracto a la que se alcanza el 50% de la absorbancia máxima (EC_{50}). El poder reductor de los hongos medicinales podría estar relacionado con la capacidad de actuar como donantes de hidrógeno (Shimada et al., 1992).

Las curvas representativas del poder reductor de los extractos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. se presentan en la figura 10. El valor de EC_{50} resultó de 32.6 $\mu\text{g/mL}$ en el extracto micelial, estadísticamente superior en comparación con el de cuerpos fructíferos (8 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$). Estos resultados obtenidos en el ensayo de poder reductor sugieren una mejor actividad antioxidante para el extracto derivado del cuerpo fructífero (figura 11).

Lung et al., 2012 refieren el papel de los grupos hidroxilo de polisacáridos, como los responsables en gran medida, de actuar como donores de electrones, reaccionando de esta forma con los radicales libres y formando productos estables y de esta manera terminar con la reacción en cadena de radicales. La capacidad reductora es significativamente incluida como una de las actividades antioxidantes a evaluar por parte de los especialistas en el tema a nivel mundial.

Muchos mecanismos relacionados con las actividades antioxidantes incluyen, iniciación en cadena, unión a metales de transición, capacidad reductora y barrido de radicales (Gülçin et al., 2003). La capacidad reductora es uno de los más importantes factores dentro de la capacidad antioxidante.

Los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. pueden contener especies reductoras, las cuales pueden reaccionar con ciertos precursores de peróxidos, previniendo de esta forma la aparición de derivados de peróxidos.

Es mundialmente conocido que la bioactividad de los polisacáridos es afectada por sus características estructurales, específicamente se ha comprobado una correlación existente entre el peso molecular y la capacidad de barrido de radicales, además de la influencia de grupos amino e hidroxilo en moléculas polisacáridicas tales como el quitosano (Guo et al., 2005). El peso molecular es uno de los rasgos estructurales más importantes de los polisacáridos. Cierta número de reportes sugieren que la potencia antioxidante está estrechamente asociada con el peso molecular de los mismos. Polisacáridos con bajo peso molecular presentan más grupos hidroxilo reductores terminales (por unidad de masa) para aceptar y eliminar radicales libres. Liu et al., 2010 obtuvieron dos polisacáridos de bajo peso molecular derivados de *G. lucidum* a los que se le determinó su actividad antioxidante. Los resultados mostraron que ambos polisacáridos son efectivos en el barrido de radicales hidroxilo y capacidad quelante de hierro. Xing et al., 2005 reportaron el efecto de barrido contra el radical superóxido de dos quitosanos de bajo peso molecular (9 KDa) por encima de otro de alto peso molecular (60 KDa). Este posible mecanismo puede estar relacionado con las características estructurales del quitosano en

Resultados y Discusión

cuestión, el cual contenía dos grupos hidrógenos y un grupo amino en cada unidad monomérica. El alto peso molecular en los polisacáridos se relaciona

con estructuras más compactas, resultando en uniones por hidrógeno intramolecular más fuertes al igual que la aparición de grupos amino más restringidos. Actualmente hay opiniones diversas sobre qué peso molecular, forma y fuente de beta glucanos proporcionan el mayor beneficio terapéutico. Todas estas características antes mencionadas pueden aportar a la explicación de las diferencias significativas en cuanto al poder reductor encontradas entre los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpo fructífero. A esto se añade la presencia significativa de proteínas y fenoles cuantificados en la muestra y su influencia directa en la potenciación de la capacidad antioxidante de extractos de polisacáridos, elementos que han sido discutidos con anterioridad en el desarrollo de este trabajo.

3.4.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante Total (CAT).

Mundialmente han sido desarrollados de diferentes métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante total de mezclas biológicas o metabolitos aislados, entre los que se destacan: capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC), parámetro total de radical antioxidante (TRAP), capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) y capacidad total de barrido de oxirradicales (TOSC).

Las propiedades reductoras de un producto natural están generalmente asociadas con la presencia de agentes antioxidantes capaces de interrumpir las reacciones en cadena de los radicales libres por donación de átomos de hidrógeno (Lijun et al., 2011). Este ensayo refleja la capacidad de un sistema de defensa antioxidante no enzimático. En este método, llamado también método del fosfomolibdeno, el molibdeno VI (Mo^{6+}) se reduce para formar un complejo de color verde de fosfato/ Mo^{5+} a pH ácido. Valores altos de absorbancia indican que la muestra posee actividad antioxidante significativa (Hudson, 1990).

En la tabla 4, se muestran los resultados de la capacidad antioxidante total de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. para una concentración de $16\mu\text{g/mL}$.

A la hora de evaluar las propiedades antioxidantes de muestras mezclas

heterogéneas de metabolitos, es necesario tener en cuenta el hecho de que la

capacidad antioxidante evaluada, puede resultar derivada de una actividad combinada de varios compuestos con función antioxidante, sus respectivas concentraciones y las posibilidades de que estos reaccionen como sinergistas o antagonistas (Laguerre et al.,2007). La habilidad de barrido de radicales libres, depende en gran medida de la talla del carbohidrato. Los polisacáridos tienen una mayor habilidad de neutralización de radicales libres que los monosacáridos, pero dicha actividad no es aun tan elevada. Polielectrolitos, tales como sulfatos, glucanos fosforilados, lipopolisacáridos y otros, exhiben habilidades antioxidantes más significativas (Laugier et al., 2012).

Unido a esto, podemos añadir, que la presencia en extractos de polisacáridos, de otros componentes tales como, proteínas, péptidos aminoácidos, fitosteroles, nucleótidos, ácidos orgánicos y microelementos, así como sus interacciones potenciales y efectos sinérgicos pueden tener un significativo impacto en el incremento de las actividades antioxidantes. Tal es el caso de nuestro estudio, donde metabolitos tales como, proteínas, fenoles y azúcares reductores, aportan considerablemente al potencial antioxidante de los polisacáridos presentes en las muestras.

Las evidencias experimentales obtenidas y en la tesis demuestran el interesante potencial de los extractos crudos de polisacáridos derivados de *Pleurotus* como nueva fuente de antioxidantes naturales para las industrias alimentaria y médico-farmacéutica, útiles en el diseño de alimentos funcionales, suplementos dietéticos y/o fármacos con aplicaciones en el manejo de las enfermedades inducidas por el estrés oxidativo.

Resultados y Discusión

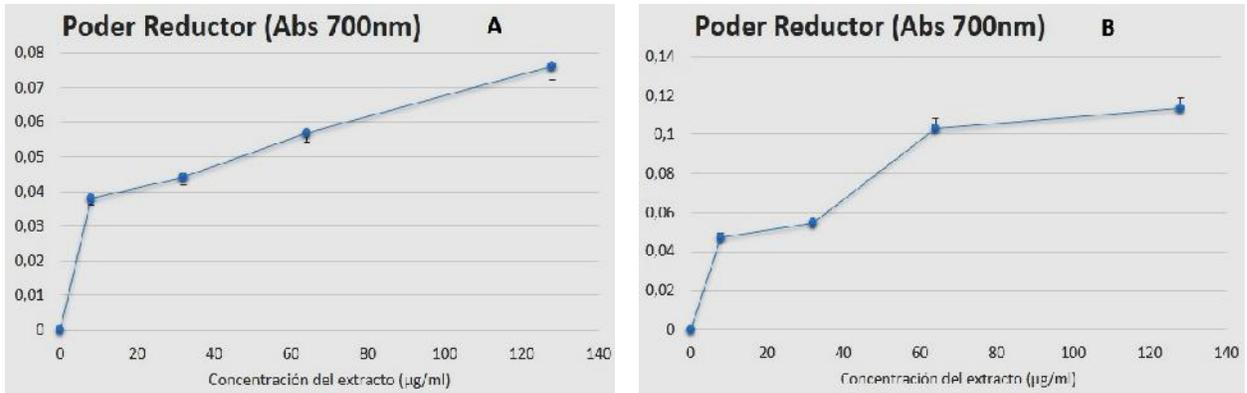


Figura 10. Poder reductor de extractos crudos de polisacáridos de cuerpos frutíferos (A) y micelio (B) de *Pleurotus* sp.

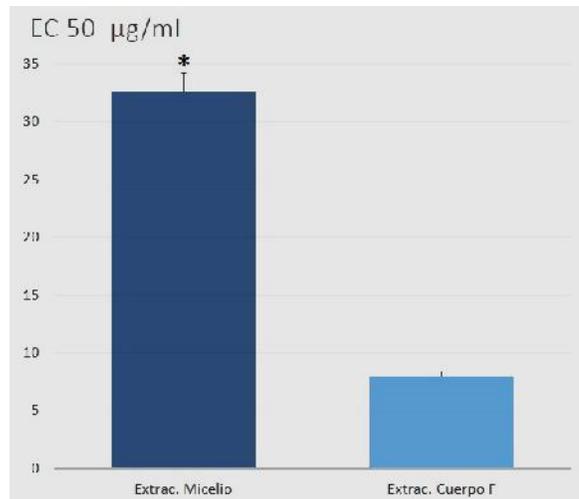


Figura 11. Valores de concentración de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos frutíferos de *Pleurotus* sp. a las que se alcanza el 50% de la inhibición máxima (EC₅₀) en el ensayo de poder reductor.

(*) Indica diferencias significativas en la prueba de la t de Student ($p < 0.05$).

Tabla 4. Capacidad antioxidante total de los extractos crudos de polisacáridos de micelio y cuerpos frutíferos

Extractos crudos de polisacáridos	Capacidad Antioxidante Total (µmol Ac. Ascórbico/mg)
Micelio	465.1 ^a ± 25.11
Cuerpos frutífero	288.1 ^a ± 87.8

(^a) letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba MW-U ($p < 0.05$). Media ±SD de tres experimentos (n=3).

CONCLUSIONES

1. El procedimiento empleado para la obtención de los extractos crudos de polisacáridos a partir de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., permitió la obtención de un total de polisacáridos con potencial antioxidante de 53 y 32 g/100g, respectivamente.
2. El contenido de azúcares reductores, carbohidratos y fenoles totales fue mayor en el extracto del crudo de polisacáridos del micelio de *Pleurotus* sp. Por otro lado, el contenido de proteínas fue mayor en extracto del crudo de polisacáridos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.
3. Los extractos crudos de polisacáridos derivados de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., en los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad, sugieren efectos no tóxicos.
4. Los resultados obtenidos, a las concentraciones evaluadas de los extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., sugieren la no actividad antibacteriana y antifúngica con las cepas evaluadas.
5. Los extractos crudos de polisacáridos a partir de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. poseen actividad antioxidante, evidenciada en ensayos de Capacidad Antioxidante Total (CAT) y poder reductor.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar en la evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. con el empleo de otros ensayos *in vitro* (químicos y celulares) y en modelos animales de patologías asociadas al estrés oxidativo.
2. Realizar la identificación y cuantificación de los compuestos polisacáridicos presentes en los extractos, lo que permitiría fundamentar las propiedades antioxidantes observadas.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos utilizados en el estudio a concentraciones superiores.
4. Evaluar la dinámica de producción de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en la fermentación sumergida de *Pleurotus* sp. CCEBI-3024 en medios de cultivo alternativos.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Referencias Bibliográficas

Aleksandar K, Lada C, Mirjana S, Jelena V, Ivan M and Biljana S. Antigenotoxic Effect of *Trametes spp.* Extracts against DNA Damage on Human Peripheral White Blood Cells. *The Scientific World Journal* 2015; 3(3):37-42.

Álvarez, J. 2009. Evaluación de algunos efectos inmunofarmacológicos de extractos hidrosolubles crudos del micelio de *Pleurotus spp.* Tesis en opción al Grado de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Cuba.

Arango, C. S., & Nieto, I. J. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología* 2013; 30, 1-8.

Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. Essential oils in combination and their antimicro-bial properties. *Molecules* 2012; 17, 3989–4006.

Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micología Aplicada Internacional* 2001; 13 (1) 25-29.

Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 2003; 91, 179–194.

Carvalho R, Brugnari T, Bracht A, Peralta R, Ferreira I. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus spp.* (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology* 2016; 50, 103-117.

Cheeseman KH and Slater TF. Free radicals in medicine. *British Medical Bulletin* 1993; 49(3), 479–724.

Cheung, P. C. Mushrooms as Functional Foods 2008; John Wiley & Sons. Cushnie T, and Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob* 2008; 26, 343-56.

Da Silva M, Naozuka J, da Luz JM, de Assunção LS, Oliveira P, Vanetti MD, y col. Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food Chem* 2012; 131(2):558-663.

Diez V.A., Alvarez A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry*, 2001; (75) 417–422.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Robers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 1956; 28: 350-356.

Ferreira ICFR, Barros L and Abreu RMV. Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medical Chemistry* 2009; 16(12), 1543–1560.

Referencias Bibliográficas

Gezer K, Duru ME, Kivrak I, Turkoglu A, Mercan N, Turkoglu H and Gulcan S. Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 2006 5: 1924-1928.

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

Griensven D. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *J Food Comp Anal* 2012; 26: 144-53.

Gülçin , Büyükokuro lu ME, Oktay M, Küfrevio lu Ö . Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *J. Ethnopharmacol* 2003; 86: 51-58.

Guo Z., R. Xing, S. Liu et al., "The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15, (20), 4600–4603.

Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Oxford. U. K. 1999; 3rd Ed.

Heleno S.A., L. Barrosc, A. Martins, M.J.R.P. Queiroz, C. Santos-Buelga, I.C.F.R. Ferreira, Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts, *Food Res. Int.* 2012; 46, 135–140.

Huang, S.J., Mau, J.L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of irradiation. *LWT-Food Science and Technology*. 2006 39: 707-716.

Hudson B.J.F. *Food antioxidants*. London, UK: Elsevier Applied Science; 1990.

Inácio, F. D., Ferreira, R. O., Araujo, C. A. V., Brugnari, T., Castoldi, R., Peralta, R. M. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*. 2015; (5). Article ID 290161.

Jaszek M, Osińska-Jaroszuk M, Janusz G, Matuszewska A, Stefaniuk D, Sulej J, Polak J, Ruminowicz M, Grzywnowicz K, and Jarosz-WilkoBazka A. New Bioactive Fungal Molecules with High Antioxidant and Antimicrobial Capacity Isolated from *Cerrena unicolor* Idiophasic Cultures. *BioMed Research International* 2013; ID 497492. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/497492>.

Klaus A, M. Kozarski, M. Niksic, D. Jakovljevic, N. Todo-rovic, L.J.L.D. Van Griensven, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*, *LWT-Food Sci. Technol.* 2011; 44, 2005-2011.

Referencias Bibliográficas

- Kosani M, Rankovi B and Daši M. Mushrooms as Possible Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2012), 11 (4): 1095-1102.
- Kozarski M, Klaus A, Nikši M, Jakovljevic D, Helsper JPF, Griensven LJLDV. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chem* 2011; 129: 1667-75.
- Kozarski M, Klaus A, Nikši M, Jakovljevic D, Helsper JPF, Griensven LJLDV. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chem* 2011; 129: 1667-75.
- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges, *Prog. Lipid Res* 2007; 46, 244–282.
- Lau BF, Abdullah N, Aminudin N. Chemical Composition of the Tiger's milk mushroom, *Lignosus rhinocerotis* (Cooke) Ryvarden, from different developmental stages. *J Agricul. Food Chem* 2013; 61:4890–4897.
- Laugier OB, Spasi SD, Mandi V, Jakovljevi D, Vrvic M M. The effects of repetitive alkaline/acid extractions of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall on antioxidative and bifidogenic efficacy, *Int. J. Food Sci. Tech* 2012; 47, 369–375.
- Li X. M., X. L. Li, and A. G. Zhou. "Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits *in vitro*," *European Polymer Journal* 2007; 43 (2) 488–497.
- Li, S., & Shah, N. P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry* 2014; 165, 262e270.
- Li, Y.R., Liu, Q.H., Wang, H.X. and T.B. Ng. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochim. Biophys* 2008; Acta 1780, 51-7.
- Lijun S, Jianbao Z, Xiaoyun L, Liyu Z, Yali Z. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 2689-96.
- Liu D, J. Sheng, Z. Li et al., "Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching," *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013; (56) 1–5.
- Liu W., H. Wang, X. Pang, W. Yao, and X. Gao, "Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from

Referencias Bibliográficas

the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*,” *International Journal of Biological Macromolecules* 2010; 46 (4) ,451–457.

Llauradó, 2016. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de bioproductos obtenidos de la seta comestible *Pleurotus* sp. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Cuba.

Lo, C.A. Chang, K.H. Chiuc, P.K. Tsayd, J.F. Jena, Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods, *Car-bohyd. Polym* 2011; 86320–327.

Lowry O.H, Rosenbrough N.J., Farr A., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J of Bio Chem* 1951; 193:265-75.

Lung MY and Huang WZ. Antioxidant properties of polysaccharides from *Laetiporus sulphureus* in submerged cultures. *African Journal of Biotechnology* 2012; 11(23) 6350-6358.

M. Zhang,S.W.Cui,P.C.K.Cheung,andQ.Wang. “Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity,”*Trends in Food Science and Technology* 2007; 18 (1) 4–19.

Maes, L., Vanden Berghe, D., Germonprez, N., Quirijnen, L., Cos, P., De Kimpe, N., Van Puyvelde, L. In vitro and in vivo activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48, 130–136.

Mau J.L., Lin H.C., Ma J.T., Song S.F. Non-volatile taste components of several speciality mushrooms. *Food Chemistry*, 2001; (73) 461–466.

Mercan N, Duru ME, Türko lu A, Gezer K, Kıvrak and Türko lu H. Antioxidant And Antimicrobial Properties Of Ethanolic Extract From *Lepista nuda* (Bull.) Cooke. *Ann. Microbiol.* 2006 56: 339-344.

Miller, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* 1959; 31: 426-428.

Mitra P, Khatua S, Acharya K. Free radical scavenging and nos activation properties of water soluble crude polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*. *Asian J Pharm Clin Res* 2013; (6) 67-70.

Newman, D.J. and Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 2007; **70**, 461-477.

Referencias Bibliográficas

- Nieto, I., Chegwin, C. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajorcajú*. *Journal of the Chilean Chemical Society* 2008; 53 (2): 1515-1517.
- Ozturk M, Duru M, Kivrak S, Turkoglu A, Ozler M. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49, 1353–1360.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 1999; 269:337-41.
- Rai, M. Free radicals and human diseases in Herbal drugs: A modern approach to understand them better, Edited by Mandal SC, *New Central Book Agency (P) Ltd.*, India 2011, 479–496.
- Ramesh Ch and Manohar G Pattar. Antimicrobial Properties, Antioxidant Activity and Bioactive Compounds from Six Wild Edible Mushrooms of Western Ghats of Karnataka, *India. Pharmacogn. Research* 2010 2: 107-112.
- Ren, L., Perera, C., & Hemar, Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & Function* 2012; 11, 1118-1130.
- Repetto G, Del Paso A, Zurita J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols* 2008; 3. 7/1125.
- Ridnour LA. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 385, 1–10.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the auto-oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40: 945 - 948.
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual method. *Am J Enol Vitic* 1977; 28: 49-55.
- Thetsrimuang C, Khammuang S, Chiablaem K, Srisomsap C, and Sarnthima. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* L'ev. *Food Chemistry* 2011; 128 (3), 634–639.
- Trinh C, Gevaert L, Kohout L, Van Standen J, Verschaeve L. Genotoxicity evaluation of two kinds of smoke-water and 3,7- dimethyl-2H-furo (2,3-c) pyran-2- one. *Journal of Applied Toxicology* 2010; 30: 596-602.

Referencias Bibliográficas

- Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007 39, 44–84.
- Valko M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160, 1–40.
- Vamanu E. Antioxidant Properties of Mushroom Mycelia Obtained by Batch Cultivation and Tocopherol Content Affected by Extraction Procedures. *BioMed Research International* 2014; ID 974804. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/974804>.
- Vanhulle S, Trovaslet M, Enaud E, Lucas M, Sonveaux M, Decock C, Onderwater R, Schneider YJ and Corbisie AM. Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24, 337–344. DOI 10.1007/s11274-007-9475-7.
- Verschaeve L, Van Gompel J, Regniers L, Van Parijs PH, Vander Lelie D. Vitotox R genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals. *Environ. Molec. Mutagen.* 1999; 33:240-248.
- Wasser S. P. “Medicinal mushroom science: history, current status, future trends and unsolved problems,” *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2010; 12 (1) 1–16.
- Wasser S., “Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002; 60, (3) 258–274.
- X. J. Wu and C. Hansen, “Antioxidant capacity, phenolic content, and polysaccharide content of *Lentinus edodes* grown in whey permeate-based submerged culture,” *Journal of Food Science* 2008; 73 (1) M1–M8.
- Xia, F., Fan, J., Zhu, M. y Tong, H. Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2011; (42), 402–407.
- Xing R, Liu S, Guo Z. “Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities *in vitro*,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13 (5), 1573–1577.
- Zhang, J., Zhao, M., Zheng, L., Zhai, G., Wang, L., Jia, M., et al. Purification and antioxidant activities of intracellular zinc polysaccharides from *Pleurotus cornucopiae* SS-03. *Carbohydrate Polymers* 2014; 111, 947e954.