



**Universidad de Oriente**

**Facultad de Ciencias Naturales**

**CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**



Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster  
en Biotecnología

Mención Industrial

**Potencialidades antioxidantes in vitro de  
extractos hidrosolubles crudos de Pleurotus sp..**

Autor: Lic. Enrique Reynaldo de la Cruz

Tutores: Dr.C. Humberto Joaquín Morris Quevedo  
Dr.C. Rosa Catalina Bermúdez Savón

**Santiago de Cuba, 2013**

**“Año 55 de la Revolución”**

## **Agradecimientos**

Agradecerle ante todo a Dios, a mis tutores de tesis Morris y Catalina por sus sabios consejos y por su nivel de compromiso.

Agradecerles a Pedro y Gabriel, como integrantes de este proyecto que contribuyeron a la realización del mismo.

También agradecerles a los profesores del claustro de la maestría que contribuyeron a mi superación, tanto desde el punto de vista personal como profesional.

Agradecerles a mis amigos Leinier, Ariel, Yamila, Yamirka y Dennis que ayudaron de manera desinteresada en la obtención de los resultados del trabajo.

En especial a mi familia y mi hijo Samuelito indispensable en mi travesía por la vida, mis abuelos y mis padres.

Agradecerles a todos que participaran de una forma u otra y que pudiera haber omitido de manera involuntaria.

De todo corazón muchas gracias.

Enrique

## Resumen

Las insuficientes evidencias experimentales y el pobre conocimiento de la naturaleza fitoquímica de los compuestos presentes en extractos hidrosolubles del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., limitan el desarrollo de formulaciones farmacéuticas enriquecidas en metabolitos bioactivos, con potenciales aplicaciones terapéuticas, en las principales enfermedades asociadas al estrés oxidativo. En el siguiente trabajo se caracterizó el contenido de fenoles totales y flavonoides, así como los minerales importantes desde el punto de vista farmacológico. La actividad antioxidante de extractos hidrosolubles en *Pleurotus* sp. a través de los ensayos de captación de radicales DPPH, ABTS, el poder reductor e inhibición de la peroxidación lipídica en membranas eritrocitarias. El procedimiento empleado para la obtención de extractos hidrosolubles a partir del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. mediante tratamiento térmico de la biomasa celular favoreció la liberación de compuestos fenólicos con una elevada capacidad secuestrante de especies reactivas de oxígeno, con valores de 38 y 58 mg/100g, respectivamente. La actividad de captación del radical ABTS y el poder reductor resultaron superiores en el preparado de cuerpos fructíferos, donde se detectó el mayor contenido de polifenoles y la presencia de flavonoides. Sólo en el ensayo de captación de radicales DPPH el extracto micelial evidenció una mejor respuesta. Los dos extractos resultaron efectivos en la inhibición *in vitro* de la peroxidación lipídica en membranas eritrocitarias, lo que se refleja en una menor producción del derivado tóxico malonil-dialdehído. Estos preparados constituyen candidatos potenciales para el diseño de alimentos funcionales, suplementos dietéticos y/o fármacos útiles en el manejo de las enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

## Abstract

The insufficient experimental evidences and the limited knowledge of the phytochemical nature of compounds contained water-soluble extracts from mycelium and fruiting bodies of *Pleurotus* and of their antioxidant pharmacological activity limit the development of preparations enriched in bioactive metabolites with therapeutical potentialities. The polyphenol content and the *in vitro* antioxidant activity of *Pleurotus* sp.. aqueous extracts (DPPH and ABTS radicals scavenging activities, reducing power and inhibition of lipid peroxidation of erythrocyte membrane assays). The procedure used for obtaining water-soluble extracts from mycelium and fruiting bodies of *Pleurotus* by cellular biomass heat treatment, favored the releasing of phenolic compounds with a high scavenging activity of reactive oxygen species, with values of 38 and 58 mg/100g, respectively. The aqueous extracts from mycelium and fruiting bodies have antioxidant properties demonstrated in assays at the chemical reactions level. The ABTS scavenging and the reducing power were higher in the fruiting bodies extract, which showed the greatest polyphenols content and the presence of flavonoids; only in the DPPH scavenging assay the mycelial extract gave a better response. Both extracts were effective in the *in vitro* inhibition of lipid peroxidation of erythrocyte membrane, as judged by the minor production of the toxic malondialdehyde derivative. These preparations are potential candidates for the design of functional foods, dietetic supplements and/or medicines useful in the management of diseases caused by oxidative stress.

## Abreviaturas

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**: Oxígeno singlete

**8 oxo-Gu**: 7-hidro-8-oxo deoxignanosina

**ADN**: ácido dextrribonucleico

**ATP**: adenosina Trifosfato

**BHT**: butil Hidroxitolueno

**CAT**: catalasa

**DMH**: dimetilhidrazina

**EGCG**: epigalocatequina

**ERNS**: especies reactivas del Nitrógeno

**EROS**: especies reactivas del Oxígeno

**F-A**: Extracto hidrosoluble del micelio.

**F-B**: Extracto hidrosoluble del cuerpo fructífero.

**G6PDH**: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

**GPx**: glutatión peroxidasa

**GR**: glutatión reductasa

**GSH**: glutatión reducido

**GSSG**: glutatión oxidado

**GST**: glutatión S-transferasa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peróxido de hidrógeno

**HO·**: radical hidroxilo

**HOCl**: ácido hipocloroso

**EC<sub>50</sub>**: Concentración Inhibitoria media.

**L·**: radical lipídico

**LDL**: lipoproteínas de Baja Densidad

**MDA**: malonil-dialdehído

**MMP**: metaloproteasas de matriz

**MSR**: metionina sulfóxido reductasa

**NO<sub>2</sub>**: óxido nítrico

**O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>**: radical superóxido

**O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>**: radical anión superóxido

**OCl<sup>-</sup>**: hipoclorito

**ONOO<sup>-</sup>**: peroxinitrito

**PAI**: Espectrometría de Plasma de Acoplamiento Inductivo

**RL**: radical Libre

**RNA**: ácido ribonucleico

**SH**: grupo sulfhidrilo

**SOD**: superóxido dismutasa

**Trx**: tioredoxina

## Índice

<b>Introducción</b> .....	1
<b>Capítulo I. Revisión Bibliográfica</b> .....	3
I.1 Propiedades antioxidantes en los hongos comestibles y medicinales. ....	3
I.2 Hongo <i>Pleurotus</i> spp.....	4
I.2.1 Clasificación taxonómica de <i>Pleurotus</i> spp.....	4
I.3 Actividad antioxidantes de <i>Pleurotus</i> sp.....	5
I.3.1 Potencialidades antioxidantes <i>in vitro</i> de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	5
I.3.2 Potencialidades antioxidantes <i>in vivo</i> de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	6
I. 4 Características principales del estrés oxidativo.....	6
I.4.1 Enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.....	7
<b>Capítulo II. Materiales y Métodos</b> .....	8
II.1 Microorganismo utilizado y Material de cultivo.....	8
II.2 Obtención de los extractos hidrosolubles crudos de micelio y cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus</i> sp.....	8
II.3 Cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos acuosos de <i>Pleurotus</i> sp..8	
II.3.1 Cuantificación de polifenoles.....	8
II.3.2 Cuantificación de flavonoides.....	8
II.4 Análisis de elementos minerales por espectrometría de plasma de acoplamiento Inductivo (PAI).....	9
II.5 Evaluación de la actividad antioxidante de extractos acuosos obtenidos de cuerpos fructíferos y micelio de <i>Pleurotus</i> sp.....	9
II.5.1 Actividad antioxidante frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidrazilo DPPH.....	9
II.5.2 Actividad antioxidante frente al radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS.....	9
II.5.3 Determinación del Poder Reductor.....	10
II.5.4 Inhibición de la peroxidación lipídica en membrana de eritrocitos de carnero.....	10
II.6 Análisis Estadístico.....	11

<b>Capítulo III. Resultado y Discusión</b> .....	12
III.1 Cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos acuosos de <i>Pleurotus</i> sp.....	13
III.2 Análisis de elementos minerales por espectrometría de plasma de acoplamiento inductivo (PAI) .....	15
III.3 Evaluación de la actividad antioxidante de extractos acuosos de <i>Pleurotus</i> sp....	17
III.3.1 Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidrazilo DPPH.....	17
III.3.2 Captación de radicales 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS.....	20
III.3.3 Determinación del poder de reducción.....	21
III.3.4 Inhibición de la peroxidación lipídica en membrana eritrocitaria.....	23
III.4 Consideraciones finales.....	25
IV. Conclusiones.....	28
V. Recomendaciones.....	29
VI. Referencias Bibliográficas.....	30

## Introducción

La evolución y desarrollo de la vida en nuestro planeta, estuvieron precedidos por la capacidad de los organismos vivos de emplear el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como fuente de obtención de energía; pero la ventaja que presenta el dioxígeno para la obtención de energía por medio de cadenas de transporte de electrones lleva a olvidar su toxicidad. Cada vez que se incorpora un electrón al oxígeno molecular se obtiene una especie reducida intermedia, que han sido denominadas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Estas ERO incluyen a los radicales libres y a moléculas derivadas del oxígeno con una elevada reactividad asociadas directamente con estados patológicos como el cáncer, aterosclerosis, Alzheimer, procesos inflamatorios, el envejecimiento, entre otros.

La relación que existe entre la concentración de radicales libres y el estado de salud de los seres humanos es un hecho aceptado en la actualidad por la comunidad científica. Como resultado existe un elevado interés sobre este tema y la avalancha informativa generada a partir de estudios de divulgación científica y popular, han propiciado miles de productos de origen natural con el calificativo de antioxidantes. Estos productos presentan la capacidad de disminuir las concentraciones de radicales libres en el organismo humano y de mejorar el estado de salud de quienes los consumen (Juranek y Bezek, 2005).

Recientemente, el cuerpo fructífero y las esporas de los hongos están recibiendo mucha atención, no solo como medicina homeopática sino como una nueva fuente promisoriosa de medicamentos. Muchas propiedades medicinales han sido atribuidas a los hongos, ya que han demostrado ser reductores del colesterol, poseer efectos antitumorales, antioxidantes, antivirales, antitrombóticos e inmunomoduladores (Mau *et al.*, 2002).

La amplia gama de metabolitos secundarios identificada en los hongos es debida principalmente a que son incapaces de sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz, por el hecho de no poseer clorofila, por lo tanto, su biogénesis está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes que conforman el sustrato donde se desarrollan, además de las condiciones climáticas que los rodean, haciendo que hongos presentes en regiones diferentes o que crezcan en sustratos que varíen en composición, puedan alterar y cambiar su metabolismo generando una amplia variedad de compuestos químicos (García-Pajón y Collado, 2003). Actualmente están siendo utilizados cultivos de algunas especies comestibles a gran escala como una alternativa de alimentación de bajo costo, rica en vitaminas, minerales, aminoácidos, fibra y baja en grasa (Ayman *et al.*, 2008).

Actualmente están siendo utilizados cultivos de algunas especies de hongos comestibles a gran escala, como una alternativa de alimentación de bajo costo, rica en vitaminas, minerales, aminoácidos, fibra y baja en grasa (Ayman *et al.*, 2008). Como ejemplo de esta tecnología se muestra el cultivo de los hongos comestibles *Pleurotus* sp. sobre sustratos como: pulpa de café, cáscara de coco, aserrín y sus mezclas. El aprovechamiento de los mismos para este cultivo se ha consolidado como una alternativa viable para la producción de alimentos de consumo humano capaces de satisfacer, en gran medida, las necesidades proteicas y nutricionales de la población en

los países subdesarrollados. Esto se sustenta en las ventajas de su bajo costo de producción, alto contenido proteico y su obtención en grandes cantidades en un corto lapso de tiempo (Bermúdez, 2010)

Estos antecedentes destacan la necesidad de estudios más profundos que posibiliten determinar la naturaleza química de los metabolitos presente en los cuerpos fructíferos y micelio de *Pleurotus* sp. Esto permitirá la preparación de extractos enriquecidos en metabolitos con una elevada potencialidad farmacológica, y su evaluación, contribuyendo así al esclarecimiento de los posibles mecanismos de acción antioxidante.

### **Problema Científico**

Las insuficientes evidencias experimentales y el pobre conocimiento de la naturaleza fitoquímica de los compuestos presentes en extractos hidrosolubles del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. limitan el desarrollo de formulaciones farmacéuticas enriquecidas en metabolitos bioactivos con potenciales aplicaciones terapéuticas, en las principales enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

### **A partir de este problema, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:**

Sí existen evidencias experimentales relacionadas con las propiedades antioxidantes de hongos comestibles-medicinales, entonces es posible que extractos acuosos, obtenidos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., evidencien un efecto protector contra la toxicidad mediada por radicales libres en sistemas experimentales *in vitro*.

### **Objetivo General**

Determinar las propiedades antioxidantes *in vitro* de extractos hidrosolubles del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

### **Objetivos específicos:**

- 1) Determinar el contenido de polifenoles totales, flavonoides y elementos minerales en extractos hidrosolubles de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.
- 2) Evaluar la actividad antioxidante de extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. mediante los ensayos a nivel de reacciones químicas de inhibición de la captación de radicales DPPH, ABTS y la estimación del poder reductor.
- 3) Evaluar la inhibición *in vitro* de la peroxidación lipídica en membrana eritocitaria de extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., mediante la estimación de los niveles de malonil-dialdehído.

## Capítulo I. Revisión Bibliográfica

### I.1 Propiedades antioxidantes en los hongos comestibles y medicinales.

Los hongos superiores son una fuente natural de potentes metabolitos antioxidantes bioactivos (Yang *et al.*, 2002). Al igual que en el reino vegetal, en los hongos, también comienzan a ser descubiertos metabolitos fenólicos que muestran ventajas antioxidantes. Nuevos tipos de estructuras moleculares han sido descritas, que ayudan a la comprensión de cómo estos metabolitos pueden luchar contra las lesiones oxidativas. Diversos mecanismos se han propuesto: I) a través del efecto antioxidante directo para la prevención de la producción de ROS; II) efecto antioxidante indirecto a través de la inducción y la regulación del sistema de defensa de enzimas antioxidantes de barrido (SOD, GPx, catalasa); III) poder reductor directo de metabolitos fúngicos; IV) efecto del barrido del radical a través de la orientación hacia ROS ya producidos.

En la actualidad los compuestos fenólicos están siendo fuertemente investigados por su alto beneficio para la salud humana. Extractos de *L. edodes* y *Volvariella volvacea*, demostraron actividad antioxidante y habilidades de barrido de radicales libres (Cheung y Cheung, 2005). Este efecto farmacológico se relaciona con compuestos fenólicos contenidos en las setas, siendo similares a los compuestos presentes en la uva y el vino (Landrault *et al.*, 2001). Se ha demostrado, además, que *L. edodes* es un potente inductor de la SOD y GPx (Cheung *et al.*, 2005).

Los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria u oxidante (Wasser, 2005). Se han descrito numerosas sustancias obtenidas de diversos basidiomicetos que han demostrado propiedades antioxidantes. Entre ellas se destacan las pertenecientes a los siguientes grupos: glicolípidos, compuestos derivados del ácido shikímico (estrobilurinas y oudemansinas), fenoles aromáticos (drosofilina, armillasirina, omfalone), derivados de ácidos grasos (ácido filibolético, ácido podoscífico), poliacetilenos (agrocibina, xerulina), policétidos (caloporósido, hericenonas A-H), nucleósidos (clitocina, nebularina), diferentes sesquiterpenos (protoilludanos, marasmanos, hirsutanos, cariofilanos, etc.), diterpenos (ciatina, estriatal), sesterterpenos (aleurodscal) entre muchas otras (Mizuno, 1999a; Wasser y Weis, 1999).

Estos se han encontrado principalmente en cuerpos fructíferos (Huang *et al.*, 2006; Mayell, 2001; 2002a; 2002b; Yang *et al.*, 2002). Conteniendo usualmente una amplia variedad de moléculas secuestrantes de radicales libres, como los polisacáridos y polifenoles (Liu *et al.*, 1997). Anteriormente, se investigó la actividad antioxidante de *G. frondosa* y se evidenció que su efecto quelante de iones ferrosos fue muy potente, considerándose como el segundo entre los más importantes hongos medicinales con propiedades antioxidantes (Mayell, 2001).

Las propiedades antioxidantes de los hongos comestibles están asociadas a componentes de bajo peso molecular, específicamente a la fracción fenólica. Dentro de los componentes de los hongos comestibles con actividad antioxidante se encuentran las enzimas, como las peroxidasas y las polifenol oxidasas (Clarke, 2007).

Desde el punto de vista médico, el aumento en la utilización de los hongos puede proporcionar potentes efectos beneficiosos sobre la salud humana, contribuyendo a la prevención de estados patológicos como el cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico. Los efectos antioxidantes, combinados con efectos antitumorales e inmunomoduladores, avanzan en dirección a las reconocidas "setas características" (Lo y Cheung, 2005; Zhou *et al.*, 2005).

Extractos acuosos y metanólicos de *A. aurícula-judae* y *P. eryngii* mostraron interesantes propiedades antioxidantes y reducción de citotoxicidad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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).

Un proteoglicano hidrosoluble (POPSS-a) aislado de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* fue sometido a varios ensayos de actividad antioxidante *in vitro*, entre ellos, barrido del radical DPPH, de radicales superóxido y radicales hidroxilos, mostrando resultados significativos de actividad antioxidante en un modo dependiente de la concentración, sugiriendo que dicho polisacárido debe ser considerado como un potente antioxidante natural (Fengguo *et al.*, 2011).

## **I.2 Hongos *Pleurotus* spp.**

### **I.2.1 Clasificación taxonómica de *Pleurotus* spp.**

*Pleurotus* sp. es un hongo saprofítico o parásito débil, descomponedor de la madera, crece abundantemente sobre aliso, balso y arce, principalmente en los valles de los ríos. La palabra *pleurotus* viene del griego "pleuro", que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo (Cardona y Cadavid, 1999).

Es un género de hongo superior perteneciente al grupo de las setas comestibles, que resulta particularmente interesante desde el punto de vista nutricional. En función de su contenido de proteína (27-48 %) con valores de cómputo químico comprendidos entre 96 y 110 %, lípidos (2-8 %), niveles tolerables de ácidos nucleicos y por la presencia, de vitaminas, minerales, fibra dietética, beta glucanos y compuestos con actividad antioxidante (Manzi *et al.*, 1999; Manzi *et al.*, 2001; Mattil *et al.*, 2001).

Reino: Fungi, Subreino: Fungi superior, División: Basidiomycota, Subdivisión: Basidiomycotina, Clase: Himenomycetes, Orden: Agaricales, Familia: Pleurotaceae, Género: *Pleurotus*.

El género *Pleurotus* comprende 40 especies diferentes que se conocen comúnmente como "Setas", las mismas presentan propiedades medicinales e importancia biotecnológica y de aplicaciones ambientales. La producción de *Pleurotus* sp. es económicamente importante en la industria alimenticia a nivel mundial. El cultivo del

*Pleurotus ostreatus* constituye la tercera parte del total de cultivos de hongos de importancia alimenticia. Nutricionalmente posee un característico sabor y propiedades aromáticas, y además es considerado 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* (marrón), *A. bisporus* (Blanco) y *Lentinus edodes* (Jayakumar *et al.*, 2011).

### **I.3 Actividades antioxidantes de *Pleurotus* sp.**

La existencia de hongos que contienen antioxidantes o incremento de actividad enzimática antioxidante, pueden ser utilizados para reducir el daño oxidativo en humanos. De 89 especies de hongos estudiadas, un extracto de *P. cornucopiae* demostró la más alta efectividad antigenotóxica y actividad antimutagénica comprobada en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Filipic *et al.*, 2002). Extractos de *P. cornucopiae* reducen significativamente el daño al ADN por peroxidación inducida en células de pulmón de hámster chino (Bohi *et al.*, 2005) y los extractos de *P. ostreatus* mitigaron la genotoxicidad, mostrado por el hecho de que suprimieron el daño inducido al ADN por varios mutágenos, en el estudio de reparación de ADN de *Drosophila*. Por otra parte, un extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *P. sajor-cajú* no tuvo efecto genoprotector ya que no previno el daño oxidativo por peroxidación inducida al ADN celular (Shi *et al.*, 2002).

Extractos metanólicos de cuerpos fructíferos de *P.ostreatus* y *P.systidius*, poseen actividad antioxidante, poder reductor, eliminación de radicales y capacidad quelante del hierro siendo más elevadas que en otros hongos comerciales (Yang *et al.*, 2002). Por otro lado, Elmastas *et al.*, (2005) reportaron, que extractos de hongos de pudrición blanca, poseen solo actividad antioxidante moderada, comparada con otros hongos comestibles. La actividad antioxidante estuvo correctamente correlacionada con el contenido total de polifenoles. Además, Lee *et al.*, (2007) mostraron que un extracto de *P.citrinopileatus* preparado a partir de cuerpos fructíferos fue más efectivo que el obtenido a partir de micelio y filtrado de caldo fermentado, probablemente debido a la elevada concentración de fenoles totales. Extractos metanólicos de cuerpos fructíferos de *P. floriday* *P. pulmonarius* mostraron similar actividad antioxidante y un extracto etanólico de cuerpos fructíferos de *P. citrinopileatus*, mostró actividad antioxidante comparable a aquellos obtenidos a partir de *P. eryngii*, *P. ferulae* y *P. ostreatus* (Lee *et al.*, 2007).

#### **I.3.1 Potencialidades antioxidantes in vitro de *Pleurotus ostreatus*.**

Estudios relacionados con la eficacia antioxidante de un extracto etanólico obtenido de *Pleurotus ostreatus* puso a prueba la capacidad de barrido de radicales OH• y O<sub>2</sub>• de dicho extracto en comparación con un estándar de ácido ascórbico. El efecto de barrido del extracto del hongo y el del ácido ascórbico resultó ser de 56,2 y 60,17%, respectivamente (Jayakumar *et al.*, 2009). El valor de IC<sub>50</sub>, que es la concentración en la que el 50% del barrido de los radicales libres es logrado, se encontró en 8 mg/mL para el extracto de hongos y 6 mg/mL para el ácido ascórbico, demostrando de esta manera las potencialidades antioxidantes de dicho extracto. Diferentes extractos de hongos también resultaron poseer un notable efecto de barrido de radicales superóxido generados en el sistema luz riboflavina-NBT (Jayakumar *et al.*, 2009).

El poder reductor del extracto etanólico de *P. ostreatus* se encontró que aumentaba cada vez en proporción directa a la creciente concentración del extracto (Jayakumar *et al.*, 2009). Además este extracto y EDTA a la concentración de 10 mg/mL, han mostrado efectos quelantes de 60,68 y 79,54%, respectivamente. La concentración del extracto y EDTA necesario para la quelación del 50% de iones ferrosos fue de 6 y 4 mg/mL, respectivamente (Jayakumar *et al.*, 2009). Esto demuestra la alta capacidad del extracto en la quelación de iones ferrosos.

### ***I.3.2 Potencialidades antioxidantes in vivo de Pleurotus ostreatus.***

El CCl<sub>4</sub> se considera un hepatotóxico típico que ejerce sus efectos tóxicos por la generación de radicales libres (Melin *et al.*, 2000). La aparición de drogas y químicos inducidos por lesión hepática, es también producto al estrés oxidativo, provocando un desequilibrio celular entre la producción y la eliminación de radicales libres (Amin y Hamza, 2005).

Han informado Nada *et al.*, (2010) que los polisacáridos insolubles de hongos, previenen la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub> en ratas. Se observó una disminución de la concentración de MDA en hígado, riñón, corazón y cerebro de ratas que habían sido inducidas con CCl<sub>4</sub>, al ser tratadas con extracto de *P. ostreatus* (Jayakumar, Ramesh, y Geraldine., 2006; Jayakumar, *et al.*, 2008).

Se ha demostrado además que el hongo *P. ostreatus* inhibe la peroxidación lipídica en el hígado, riñón, corazón y cerebro (Jayakumar, Thomas, y Geraldine, 2007) y carbonilos proteicos (Jayakumar, Thomas, Ramesh, y Geraldine, 2010) en hígado y riñón de ratas envejecidas. La disminución de la eficiencia funcional de los sistemas de defensa antioxidante ha venido a ser uno de los principales factores que contribuyen al proceso de envejecimiento (Reiter, 1995). Los declives, directamente relacionados con la edad, de las actividades de CAT, SOD y GPX se han reportado en varios órganos de ratas como el hígado, riñones, corazón, pulmones y músculos (Arivazhagan *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007; Loo *et al.*, 2003; Valls *et al.*, 2005) y en los eritrocitos (Inal *et al.*, 2001).

### **I.4 Características principales del estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo consiste en el aumento de la velocidad de generación de especies oxidantes o una disminución en la actividad de los sistemas de defensa, resultando un aumento sostenido de concentraciones en estado estacionario de las especies reactivas del oxígeno. En situaciones de estrés oxidativo se manifiestan los efectos tóxicos de las especies reactivas del oxígeno, produciendo primero un daño celular reversible, desencadenando un daño irreversible e, incluso muerte celular si el estrés oxidativo persiste (Raha y Robinson, 2000). El estrés oxidativo contribuye al desarrollo de una amplia gama de enfermedades incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las patologías causadas por la diabetes, la artritis reumatoide y la neurodegeneración en enfermedades de las neuronas motoras. En muchos de estos casos, no es claro si los oxidantes desencadenan la enfermedad, o si se producen como consecuencia de esta y provocan los síntomas de la enfermedad (Lenaz, 2001).

#### ***1.4.1 Enfermedades asociadas al estrés oxidativo.***

Se ha comprobado que los radicales libres pueden desempeñar una función importante en la patogenia de las complicaciones vasculares a través de los mecanismos de autoxidación de la glucosa y generación de radicales libres (RL) derivados del oxígeno. Niveles elevados de RL se han encontrado en eritrocitos, plasma, retina de animales y pacientes diabéticos, lo que se correlaciona con el control metabólico. Todos los antioxidantes endógenos se han encontrado disminuidos en los tejidos y en la sangre de individuos diabéticos (Krieger y Liskay, 2005).

Como consecuencia de la elevada reactividad de las ERO, los blancos farmacológicos de los mismos son múltiples; y en consecuencia, numerosas las patologías asociadas a la acción nociva de estas especies. En la actualidad se han estudiado casi cien enfermedades en las que existen evidencias experimentales sobre la incidencia del desbalance del estado oxidativo en su surgimiento y desarrollo; entre ellas cardiovasculares, neurológicas, endocrinas, respiratorias, inmunológicas, gastrointestinales y oncológicas (Pérez *et al.*, 2009).

A continuación se relacionan ejemplos de las más significativas, por sistema de órganos: Sistema cardiovascular: aterosclerosis, infarto del miocardio, cardiopatía alcohólica, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, entre otras (Roberts y Sindhu, 2009). Sistema nervioso: enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, isquemia o infarto cerebral, diversos tipos de ataxia, enfermedad de Huntington, entre otras (Qureshi y Parvez, 2007). Sistema respiratorio: Distrés respiratorio, enfisema pulmonar, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, entre otras (Romieu, 2008).

Sistema osteomuscular: Artritis reumatoidea. Sistema endocrino, diabetes. Sistema sensorial: cataratas, daño degenerativo de la retina, fibroplasia retrolental. Sistema excretor: nefrotoxicidad. Sistema inmune: síndromes autoinmunes, SIDA. Sistema digestivo: esteatosis hepática, lesiones hepáticas inducidas por el alcohol, cirrosis hepática, hepatitis tóxicas, entre otras (Cederbaum *et al.*, 2009; Lewis y Mohanty, 2010). Otras enfermedades o estados no localizados, multicasuales o generales y que también están relacionados con el estrés oxidativo son: el cáncer, la psoriasis (Zhou *et al.*, 2009), procesos inflamatorios, la apoptosis celular y el envejecimiento, entre otros (Pérez *et al.*, 2009).

Contar con nuevas alternativas para la suplementación de antioxidantes, con fines terapéuticos constituye una necesidad en nuestros días. Extractos acuosos de *Pleurotus* sp. pudieran demostrar un interesante potencial 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.

## Capítulo II. Materiales y Métodos

### II.1 Microorganismo utilizado y condiciones de cultivo.

Los experimentos se realizaron en la Planta de Investigación-Producción de Setas Comestibles y en el Laboratorio de Inmunología y Microbiología del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente.

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 incubadas a 37°C hasta lograr un crecimiento micelial total.

### II.2 Obtención de los extractos hidrosolubles 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%);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1%);  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1%), pH 5. Se empleó una zaranda (MIZARD, 2001) a 120 rpm. Una vez alcanzada la biomasa celular se filtró y el micelio resultante se lavó exhaustivamente con agua destilada y se pesó en una balanza técnica (Owa Labor). Se añadieron 5 mL de agua destilada por cada gramo de micelio obteniéndose el preparado (F-A) mediante la extracción durante 10 h a una temperatura de 90-95°C.

Los cuerpos fructíferos se obtuvieron mediante fermentación en estado sólido (FES) utilizando como sustrato pulpa de café, previamente pasteurizada, bajo las condiciones de cultivo referidas por (Bermúdez *et al.*, 2001). La extracción se realizó de manera similar al caso anterior y el biopreparado resultante se denominó (F-B).

Ambos extractos se filtraron a través de gasa estéril y centrifugados a 3000 rpm durante 10 min y determinándose el rendimiento de extracción en cada caso. Los extractos resultantes se conservaron a 4°C durante el período experimental.

### II.3 Cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos acuosos de *Pleurotus* sp.

#### II.3.1 Cuantificación de polifenoles.

La determinación del contenido de polifenoles se llevó a cabo según la modificación realizada al procedimiento descrito por (Hoangland, 1990). Una alícuota de 0,5 mL de los extractos de micelio y cuerpos fructíferos se transfirió a un tubo de ensayo, donde a continuación se le añadió 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 50%, dejándose reaccionar durante 5 min a 30°C en cuarto oscuro. Luego, se adicionaron 2 mL de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Después de 1 h de reposo se determinó la absorbancia a 765 nm y se comparó con una curva de calibración realizada con ácido tánico (13-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $y = 0.009x - 0.123$ ;  $R^2 = 0,993$ ). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  en equivalentes de ácido tánico por mL del extracto y como mg en equivalentes de ácido tánico por 100 g del extracto base seca.

#### II.3.2 Cuantificación de flavonoides.

Para la determinación del contenido de flavonoides (Choit *et al.*, 2006), se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de los extractos, los cuales se mezcló con 1.25 mL de agua destilada y 75  $\mu\text{L}$  de una

solución al 5% de NaNO<sub>2</sub>. Luego de 5 min se añadió a la mezcla 150 µL de una solución acuosa de AlCl<sub>3</sub> al 10%. Después de transcurrido 6 min se añadieron 500 µL de NaOH 1 M y 275 µL de agua destilada. La solución se mezcló y se determinó la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro (Pharo-300). Se utilizó la catequina para la curva de calibración ( $y=0.9629x-0.0002$ ;  $R^2=0.9999$ ). Los resultados se expresaron como µg en equivalentes de catequina por mL del extracto y como mg en equivalentes de catequina por 100 g del extracto en base seca.

#### **II.4 Análisis de elementos minerales por espectrometría de plasma de acoplamiento inductivo (PAI) para extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos.**

En este estudio se consideraron elementos minerales de interés desde el punto de vista nutricional y farmacológico como el Cobre (Cu), Hierro (Fe), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Manganeso (Mn), Magnesio (Mg) y Zinc (Zn). Se procedió a la digestión de 10 mL de los extractos hidrosoluble de cuerpos fructíferos y micelio en una mezcla de ácidos nítrico/clorhídrico. La determinación de metales en la muestra se realizó por el método 3120 B: Método de plasma de acoplamiento inductivo (PAI) (APHA, 1992).

#### **II.5 Evaluación de la actividad antioxidante de extractos hidrosolubles de *Pleurotus* sp.**

##### ***II.5.1 Actividad antioxidante frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidrazilo DPPH.***

El radical libre 2,2 difenil -1-picrilhidrazilo es un radical que permanece estable cuando se le disuelve en etanol, presentando el mismo un máximo de absorbancia a los 517 nm. El ensayo se basa en la reducción del radical libre estable 2,2 difenil -1-picrilhidrazilo por los antioxidantes que se encuentren en la solución a evaluar.

Un mililitro de la solución a evaluar se mezcló con 0,5 mL de solución etanólica de DPPH al 0.1 mM (Sigma, ref. D9132), se mezcló y se incubó a 25<sup>o</sup>C por 1 h. Al cabo de este tiempo se midieron las absorbancias a 517 nm en un espectrofotómetro VIS-723G. Como blanco de absorbancia se utilizó una solución del propio DPPH, y como control positivo una solución de ácido ascórbico (1 mg/mL). La ecuación para determinar el por ciento de inhibición del radical DPPH fue:

$$IpDPPH \% = (AP-AM)/AP *100 \quad (1)$$

Donde:

Ip: Por ciento de inhibición (del ingles Inhibition per cent).

AM = Absorbancia del extracto evaluado (Muestra)

AP = Absorbancia del DPPH o blanco (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

##### ***II.5.2 Actividad antioxidante frente al radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS.***

Según la metodología desarrollada por (Choi *et al.*, 2006) el catión ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico)) se generó por una mezcla de 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato de potasio en agua destilada, dejando reposar la mezcla durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Se tomaron 10 mL de la mezcla y se diluyó con 840 mL de agua destilada. Se tomaron 50 µL de diferentes concentraciones e cada extracto, añadiéndole 3 mL de solución de ABTS diluido y

luego de 90 minutos se midió la absorbancia a 414 nm. Como blanco de absorbancia se utilizó una solución de 50 µL de agua destilada y 3 mL de solución diluida de ABTS. La captación de radicales ABTS por los extractos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. fueron estimados en función de las concentraciones de los extractos a las que se alcanza el 50% de la inhibición (EC<sub>50</sub>).

### II.5.3 Determinación del Poder Reductor.

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 enfriadas se añadieron 2,5 mL de ácido tricloroacético (100 g/mL). A continuación se procedió a centrifugar a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se tomaron 5 mL del sobrenadante, al cual se le añadió 5 mL de agua destilada y 1 mL de cloruro férrico (1 g/L). Las muestras se leyeron 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<sub>50</sub>) (Barros *et al.*, 2007).

### II.5.4 Inhibición de la peroxidación lipídica en membranas eritrocitaria.

Los lípidos polinsaturados son compuestos inestables que tienden a degradarse rápidamente en una variedad de productos que incluyen: dienos conjugados, alcanos, productos aldehídicos etc. todos ellos medibles por diferentes procedimientos. El método más comúnmente utilizado para tejidos y fluidos animales, es la medición del malondialdehído (MDA) acoplado a reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA), cuyo resultado es un aducto cromogénico, que puede medirse espectrofotométricamente a 532 nm. Para este ensayo se siguió la metodología descrita por Lanio *et al.*, (1988).

Se partió de una suspensión de eritrocitos de carnero al 20% (v/v) en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) a partir de unos mililitros de eritrocitos previamente lavados. Se adicionaron en un beaker los siguientes reactivos: 8 mL de suspensión de eritrocitos; 7,52 mL de salina fisiológica; 0,08 mL de FeCl<sub>3</sub> a 0,5 mol/L; 0,4 mL de ácido ascórbico a 0,5 mol/L. La mezcla resultante se incubó a 37°C en un baño termostataado con agitación. Se tomaron alícuotas de 2 mL a los tiempos 0; 10; 30; 60; 90; 120 minutos y transferidas a tubos de ensayo que contenían 1 mL de ácido tricloroacético al 10%.

Se procedió a agitar en vortex durante 1 min y después de colectadas todas las muestras, se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min. Se tomaron 2 mL de los sobrenadantes los que fueron transferidos a tubos de ensayo que contenían 2,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,335%. Se preparó un blanco con 2 mL de TCA al 3,3% y 2,5 mL de TBA al 0,335%. Seguidamente fueron colocados los tubos en un baño de agua hirviendo durante 5 min, dejándolos luego enfriar hasta 20 a 25°C durante 5 min. Se procedió a lectura de las muestras a 535 nm contra el blanco reactivo. Con los valores de absorbancia obtenidos, se procedió al cálculo del por ciento de inhibición de peroxidación lipídica a través de la estimación de los niveles de malondialdehído (MDA) con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ LPI} = (\text{AC} - \text{A}) / \text{A} * 100 \quad (2)$$

Donde:

Ac = Absorbancia del control

A = Absorbancia de la muestra (Guha *et al.*, 2011).

## **II.6 Análisis estadístico.**

Para la cuantificación de polifenoles y flavonoides, la determinación del poder reductor y la evaluación de la actividad antioxidante frente al radical ABTS, se utilizó el test de la t de Student para un nivel de significación de  $P < 0.05$  y  $P < 0.001$ . En el caso de la evaluación de la actividad antioxidante frente al radical DPPH y el ensayo de la inhibición de la peroxidación lipídica de la membrana eritrocitaria por extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., los datos fueron procesados mediante análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, por rango de Kruskal-Wallis.

En los casos en que se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), se aplicó la prueba de Student-Newman-Keuls no paramétrica para la comparación de las medianas. Se realizaron análisis de correlación y regresión lineal simple para evaluar la asociación y la dependencia, respectivamente, existente entre la actividad antioxidante estimada mediante los ensayos del ABTS y poder reductor con relación a la concentración de fenoles totales en los extractos. Se utilizó en el procesamiento de los datos el software profesional Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corporation, 1994-2001).

### Capítulo III. Resultados y Discusión

El aumento de las enfermedades crónicas y degenerativas se ha convertido en un importante problema de salud en los países desarrollados, y en aquellos que como Cuba exhiben indicadores de salud similares a éstos. El estrés oxidativo causado por la acción de las especies reactivas de oxígeno (EROs) es un factor de gran importancia en el inicio y la progresión de un número considerable de enfermedades crónicas, entre las que se destacan el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las neurodegenerativas (ej. Alzheimer y Parkinson) y las inflamatorias (Racchi *et al.*, 2002). Esto ha provocado un aumento del interés por investigar posibles factores preventivos de estos procesos.

Las tendencias mundiales de la alimentación, en los últimos años, indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos que, además de contener nutrientes, contengan sustancias fisiológicamente activas que cumplan, al igual que los nutrientes esenciales, una función beneficiosa en la reducción de ciertas enfermedades. A estos alimentos, se les ha denominado “*alimentos funcionales*” y se viene realizando la identificación de ciertos principios activos, a fin de evaluar su seguridad y las dosis respectivas a utilizar, estableciéndose, en la mayoría de los casos, marcadores analíticos y marcadores farmacológicos; realizándose, además, ensayos clínicos controlados a doble ciego, demostrando sus efectos bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos y toxicológicos (Castañeda *et al.*, 2008).

Los antioxidantes representan la principal defensa del organismo contra la toxicidad mediada por los radicales libres (Janardhanan, 2000). En este sentido, los hongos comestibles, que desde tiempos inmemoriales han constituido una parte integral de la dieta humana normal, han sido descritos como una fuente de compuestos antioxidantes como las vitaminas A, C y el  $\beta$ -caroteno. Las setas contienen además, numerosos compuestos fenólicos, potentes secuestradores de radicales peróxido (Murcia *et al.*, 2002). En este sentido, Mau *et al.* (2002) refirieron una elevada capacidad antioxidante en *Ganoderma lucidum* y demostró que los fenoles constituían los componentes mayoritarios con esta acción farmacológica.

Existe un amplio número de métodos para evaluar capacidad antioxidante *in vitro*, aunque todavía no existe un consenso sobre la combinación más adecuada de estos métodos para determinar la capacidad antioxidante de una muestra. Igualmente, aunque existen marcadores del daño oxidativo a biomoléculas los resultados *in vivo* siguen siendo contradictorios.

No obstante, las investigaciones en el campo de los hongos comestibles han estado esencialmente enfocadas al estudio de su valor dietético y en consecuencia, existe poca información relacionada con su actividad antioxidante y su posible uso en la inhibición del estrés oxidativo. A partir de las experiencias de nuestro grupo de trabajo acerca de las propiedades inmunomoduladoras de extractos hidrosolubles crudos de *Pleurotus* sp., obtenidos tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos (Morris *et al.*, 2012), esta tesis profundiza en el estudio del contenido de compuestos fenólicos y minerales de dichos preparados y en la evaluación de sus potencialidades como nuevas fuentes de antioxidantes naturales para las industrias alimentaria y médico-farmacéutica.

### III.1 Cuantificación de polifenoles y flavonoides en extractos acuosos de *Pleurotus* sp.

En el presente estudio, el rendimiento de extracción de las preparaciones acuosas, obtenidas del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. mediante tratamiento térmico de la biomasa celular, resultaron de 7% y 15.6%, respectivamente, como se muestra en la Tabla 1. Bruijn *et al.*, (2008) al estudiar la influencia del tratamiento térmico de cuerpos fructíferos de *Grifola gargar* en las propiedades antioxidantes de extractos hidroalcohólicos, encontraron que el aumento de la temperatura y el tiempo de calentamiento incrementó ligeramente el rendimiento de extracción. Por su parte, Choi *et al.*, (2006) refirieron incrementos en el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de extractos del hongo shiitake en la medida que aumentaban la temperatura y el tiempo de calentamiento. Los rendimientos obtenidos en nuestro estudio se corresponden con los referidos por Bruijn *et al.*, (2008) de 14.02-17.41%. en cuerpos fructíferos de *Grifola gargar*.

En un extracto de *Lentino edodes* Carolina *et al.*, (2004) informó, como el contenido de polifenoles aumentó, a medida que se prolongaba el tiempo de ebullición, alcanzando un máximo a los 12 minutos (5.61 mg ác. gálico equivalentes/g muestra seca), después de éste tiempo disminuyó la concentración de los polifenoles.

Álvarez en 2009, informó los metabolitos secundarios de mayor importancia farmacológica presentes en extractos hidrosolubles crudos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. CCEBI-3024. El tamizaje fitoquímico ofrece información cualitativa y permite identificar los tipos de sustancias presentes mayoritariamente en los extractos; esta información representa un antecedente para la realización de estudios químicos más profundos.

En la Tabla 1 se presenta el contenido de polifenoles y flavonoides en extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. Las curvas de calibración correspondiente a la catequina (flavonoides) y los fenoles totales expresados como ácido tánico fueron:

$$y=0.9629x - 0.0002 (R^2=0.9999) \quad (3)$$

$$y= 0.0098x-0.1231 (R^2=0.993) \quad (4)$$

La utilización del ácido tánico para la curva de calibración en la determinación del contenido de polifenoles, obedece a que según Ferreira *et al.* (2009), que los ácidos fenólicos han sido reportados como los compuestos polifenoles mayoritarios en los hongos. Puttaraju *et al.* (2006) informó entre los principales compuestos fenólicos detectados en extractos acuosos de diferentes hongos comestibles silvestres de la India al ácido gálico, tánico, protocatéquico y el gentísico.

Los resultados indican la existencia de una elevada concentración de compuestos fenólicos en el extracto de cuerpos fructíferos 58 mg/100 g, superior estadísticamente a la presente en el extracto micelial (p=0.001). Este resultado es similar al referido por Choi *et al.*, (2006) de 54.6 mg/100 g.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de polifenoles y flavonoides en extractos de hongos comestibles. Se observa que los valores obtenidos de los flavonoides son menores que los de los polifenoles, lo que es normal. Por otra parte, las concentraciones en los cuerpos fructíferos de polifenoles y flavonoides de este trabajo fueron superiores en los dos extractos hidrosolubles de *Pleurotus* sp., sin embargo no se obtuvo flavonoides en el extracto del micelio.

Tabla 2. Concentraciones de polifenoles y flavonoides en extractos de hongos comestibles-medicinales

Especies de hongos	Composición de polifenoles	Flavonoides	Referencias Bibliográficas
<i>Pleurotus</i> sp.	58 mg/100g CF	3.6 mg/100g CF	Este trabajo
	38 mg/100g M	No se obtuvo	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	42.47 mg/100g CF		Pornoriya y Kanov (2009)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	37.98 mg/100g CF		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	8.52 mg/100g CF	1.82 mg/100g CF	Vekatakrisnan <i>et al.</i> , (2010)
<i>Lentinula edodes</i>	26.51 mg/100g CF	2.5 mg/ 100 g CF	Choi <i>et al.</i> , (2006)
<i>Russula delica</i>	47.01 mg/100g CF		Ayman, <i>et al.</i> , (2008)

Donde

CF: Cuerpos fructíferos

M: Micelio

En este estudio los flavonoides sólo fueron detectados en el extracto de cuerpos fructíferos (3.6 mg/100 g). Barros *et al.*, (2007) informaron la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos del micelio de *Leucopaxillus giganteus* cultivado en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno; el mayor contenido se alcanzó a los 60 días en  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (23.6 y 1.35 mg/g de fenoles totales y flavonoides, respectivamente).

El contenido de compuestos fenólicos en los extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. en nuestro estudio fue superior al referido por Iwalokun *et al.*, (2007), que refieren niveles de 325.7 y 352.8  $\mu\text{g/mL}$  en extractos obtenidos con éter de petróleo y acetona, respectivamente. En particular, el extracto acuoso de cuerpos fructíferos mostró valores que superan a los del té verde ( $1743 \pm 175$  vs.  $1005.3 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Palacios *et al.*, (2011), estimaron el contenido de fenoles totales y flavonoides en ocho especies de hongos comestibles: seis silvestres (*Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Canthabellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lactarius deliciosus*) y dos cultivables (*Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*). Los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides, en términos de materia seca, estuvieron en el intervalo de 1-6 mg/g y 0.9-3 mg/g, respectivamente.

Es controversial la consideración de autores como Iwalokun *et al.*, (2007), que sostienen que los hongos representan una pobre fuente de flavonoides, asociado probablemente a cierta ventaja biológica que la ausencia de estas moléculas proporcionaría en diversos nichos ecológicos. Xie *et al.*, (2003) refirieron para estos compuestos actividad inhibitoria de diversas enzimas, como la tirosinasa que interviene en su pigmentación, crecimiento y desarrollo. Estos criterios divergentes podrían estar relacionados con las limitadas evidencias disponibles con relación a la evaluación del contenido de flavonoides totales en los hongos comestibles-medicinales, aspecto éste señalado por Palacios *et al.*, (2011). Este autor plantea que la concentración de flavonoides depende de la especie en cuestión y no se correlaciona necesariamente con el contenido de compuestos fenólicos.

Se ha descrito la existencia de correlación positiva entre la actividad antioxidante de extractos de hongos comestibles-medicinales con el contenido de compuestos fenólicos. Lim *et al.*, (2007) refirieron una elevada correlación entre la actividad secuestradora de radicales libres, la inhibición de la producción de óxido nítrico por células inflamatorias y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de *Tricholoma matsutake*.

### **III.2 Análisis de elementos minerales por espectrometría de plasma de acoplamiento inductivo (PAI) para cuerpos fructíferos y micelio.**

Tradicionalmente, el análisis elemental de las drogas vegetales incluye la determinación de minerales como sodio, calcio, potasio y magnesio, entre otros (Sturion, 2000). Se enfocó el estudio en la determinación de algunos minerales que presenten importancia desde el punto de vista nutricional y farmacológico y que usualmente forman parte de enzimas y proteínas celulares, referidos en la Tabla 3.

En el caso de *Pleurotus* sp. se han encontrado, cantidades significativas de Zn, Cu y Mg, con proporciones moderadas de Fe y Mn. El calcio, aluminio y sodio se han encontrado en pequeñas cantidades, y se han informado trazas de arsénico y mercurio aunque en concentraciones atóxicas (Breene, 1990).

Se destacan los elevados valores de Zn, Fe y Ni, elementos de especial relevancia en el equilibrio REDOX de los organismos vivos (Hincapié, 1993). Aparte el Mg con una concentración de 0.038 g/200g de peso seco fue uno de los elementos que presentó una mayor concentración en cuerpos fructíferos. Alberts, (1998) informó niveles de 0.013 g/ 100g de peso seco en *Pleurotus ostreatus*. Moreira *et al.*, (2007) por otra parte refirió un valor de 0.014 g/100g en cuerpos fructíferos valor cercano al obtenido en nuestro estudio.

En nuestro estudio se observó una mayor concentración de los diferentes minerales en el extracto de micelio respecto al de cuerpos fructíferos. En este sentido se ha informado la presencia de elevadas concentraciones de Ni, Fe y Zn en el micelio en comparación con los cuerpos fructíferos de *Agaricus bisporus* (Chaoui *et al.*, 2005).

Estudios experimentales realizados en ratas, señalan que el Mg manifiesta propiedades protectoras contra la lipoperoxidación en algunos tejidos; aunque los mecanismos

involucrados en esta actividad, no están totalmente esclarecidos, se presume que el Mg podría incrementar la actividad de la SOD, actuar como un capturador de radicales hidroxilo y superóxido, promover la síntesis de metalotioneínas e interferir por competencia con los iones Fe (Chaoui *et al.*, 2005; Olin *et al.*, 2003; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Encontramos un valor superior de Cu, al informado por Mattila *et al.*, (2001) en cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. (0.042 g/200g de biomasa). El Cu es el cofactor de varias enzimas involucradas en el balance REDOX del organismo, entre ellas la SOD dependientes de cobre y de cobre-zinc, la ceruloplasmina, la citocromo oxidasa y la monoaminoxidasa (Sorensen, 2002).

Con respecto a la concentración de Zn, Mattila *et al.*, (2001) refirió 0.140 g/200g de biomasa en cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp y en nuestro estudio, fue superior. El Zn es menos tóxico que el Cu, actúa como cofactor de más de 300 enzimas, por sí mismo, no posee ninguna acción antioxidante pero es un elemento indispensable en la actividad de algunas enzimas antioxidantes (Girgin y Yildirim, 2004). Además, es el único elemento metálico para el que se conocen enzimas en cada una de las seis categorías en las que éstas se clasifican; desempeña un papel esencial en la división celular y se asocia su déficit a problemas en el crecimiento y desarrollo en humanos (Sorensen, 2002).

La presencia de Zn y Cu podría complementar las acciones preventivas y reparadoras de los bioflavonoides y ácidos grasos insaturados, así como sus funciones de cofactores enzimáticos de la SOD y otras metaloenzimas, que actúan como secuestradores del exceso de radicales libres (Beck, 2000). La deficiencia de estos elementos en el plasma humano se ha correlacionado con la incidencia de diversas enfermedades inflamatorias, entre las que se destaca la neuritis oftálmica y periférica. Se ha informado, además que la actividad antioxidante del Zn influye en la estabilización no enzimática de membranas (Chihuilaf *et al.*, 2002); colabora en la estabilización del ADN, ARN y ribosomas e interviene en la protección y estabilidad de las membranas frente a los RLO (Chihuilaf *et al.*, 2002).

El Zn puede ejercer sus efectos en forma mediata o inmediata. La primera requiere de una prolongada exposición al Zn, lo que desencadena la inducción de metalotioneínas, que cumplen la acción antioxidante. La mecánica del efecto inmediato se desarrolla por dos vías: reduciendo la formación de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno mediante la competencia con los iones  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{+}$  que participan en la reacción de Fenton; o disminuyendo la susceptibilidad de los grupos sulfidrilos de las proteínas a la oxidación. Se ha informado, además, que la actividad antioxidante del Zn influye en la estabilización no enzimática de membranas (Chihuilaf *et al.*, 2002).

Si bien los metales de transición  $Fe^{+2/+3}$  y  $Cu^{+/+2}$  desarrollan importantes funciones antioxidantes, como constituyentes de enzimas y proteínas, también pueden actuar como poderosos generadores de radicales libres por encuentran en altas concentraciones. La forma reducida de estos iones,  $Fe^{+2}$  y  $Cu^{+}$ , son más reactiva que su forma oxidada,  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$ . Los iones  $Fe^{+2}$  y  $Cu^{+}$  promueven la descomposición del

peróxido de hidrógeno cuyo producto final más importante es el radical hidroxilo (Chihuailaf *et al.*, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Existen evidencias, reportadas en diferentes publicaciones, de la presencia de selenio en extractos hidrosolubles del género *Pleurotus sp.*, tanto en cuerpos fructíferos como en micelio (Falandysz *et al.*, 2008); desafortunadamente, en nuestro trabajo no fue posible la determinación de este elemento, pero lo tendremos en cuenta para estudios futuros.

El selenio es un constituyente fundamental de más de 30 enzimas (Pardo *et al.*, 2006); varias de las cuales se encuentran involucradas en el balance REDOX del organismo (Ullmann's, 2002). El selenio se ha encontrado en diferentes formas químicas (Falandysz *et al.*, 2008). Ha demostrado ser un potente inhibidor del cáncer hepático en numerosos modelos experimentales (Dipple *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1991, 1997). En los últimos estudios realizados se utilizó un nivel de 200  $\mu\text{g d}^{-1}$  bajo la forma de levadura enriquecida en selenio. Se han obtenido resultados prometedores en algunos estudios de intervención clínica con combinaciones de selenio con  $\alpha$ -carotenos y  $\alpha$ -tocoferol, en respuesta se obtuvo un menor número de casos de mortalidad por cáncer de estómago (Navarro *et al.*, 1999).

Algunos estudios en cultivo celulares ponen de manifiesto que el Se puede ejercer su efectos quimioprotectores a través de la inducción de apoptosis y de la inhibición del crecimiento celular en células transformadas (Lu *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1997). Se ha llegado al consenso de que una concentración sérica de selenio inferior a 45  $\mu\text{g d}^{-1}$  puede correlacionarse con un incremento del riesgo de padecer cáncer (Torra *et al.*, 1997).

### **III.3 Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidrosolubles de *Pleurotus sp.***

El potencial antioxidante de una sustancia puede ser atribuido a varias de sus características, se destacan entre las más importantes, la capacidad para secuestrar y reducir radicales libres, acomplejar metales de transición e inhibir la peroxidación lipídica (Rajeshwar *et al.*, 2005).

La actividad antioxidante de los extractos fue evaluada por cuatro métodos diferentes: DPPH, ABTS, Poder reductor y la inhibición de la peroxidación lipídica. Los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos dependiendo del sistema de reacción o la fuente radical u oxidante (Prior *et al.*, 2005).

#### **III.3.1 Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH).**

Los métodos para evaluar la actividad antioxidante, pueden ser *in vitro* o *in vivo*, los métodos *in vitro* nos permiten tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Los métodos más utilizados son DPPH y ABTS, ambos métodos, presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse sin preparación previa mientras que los radicales ABTS tienen que ser generados tras una reacción que

puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potásico, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) o electroquímica (Kuskoski *et al.*, 2005).

La revisión de la bibliografía muestra un elevado número de publicaciones en los últimos tiempos, que incluyen la medición de la actividad frente al DPPH, tanto de extractos totales de plantas como de sustancias aisladas. El radical DPPH es un radical estable, por tal motivo ha sido ampliamente utilizado en la determinación de las características antioxidantes de una sustancia o extracto. Si la sustancia evaluada posee actividad antioxidante directa, será capaz de reducir al 2,2 difenil -1-picrilhidracilo por acción sobre él, ya sea por transferencia de un electrón o de un radical hidrógeno (Mruthunjaya y Hukkeri, 2008). El DPPH absorbe significativamente a 517 nm, por lo que, la disminución de la absorción a esta longitud de onda, se interpreta como la desaparición del mismo producto de la acción del antioxidante.

Los resultados de la reducción de radicales DPPH por los extractos acuosos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. se muestran en la Figura 1. Se observó que el porcentaje de inhibición fue superior en el extracto micelial (96.05%) y que no se diferenció significativamente del valor obtenido con el ácido ascórbico utilizado como control positivo (96.27%) ( $p=0.021$ ). El porcentaje de inhibición en el caso del extracto de cuerpos fructíferos fue de 90.35%.

La inhibición de radicales DPPH de extractos hidroalcohólicos de *Grifola gargal*) estuvo comprendida entre el 84% y 90% (Bruijn *et al.*, 2008). Por su parte Venkatakrisnan *et al.*, (2010) obtuvieron valores de inhibición de un 90.42 % para extractos etanólicos de *Pleurotus* sp. en cuerpos fructíferos, valor muy similar al informado en nuestro estudio. El porcentaje de inhibición de radicales DPPH de determinados hongos comestibles y medicinales se encontró en un rango de 85.4% a 11.3% para un valor específico de *Pleurotus pulmonaris* de 49.5 % (Ramesh *et al.*, 2010). Con relación a extractos metanólicos obtenidos de micelio se ha observado valores de inhibición del DPPH para *Pleurotus pulmonaris* de 13.77% y *Pleurotus eryngii* 15% (Barros *et al.*, 2010).

A partir de extractos acuosos obtenidos de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor-caju*, Pornariya y Kanov, (2009) informaron valores de captura del radical DPPH de un 87% y 75% respectivamente, ambos valores, inferiores al obtenido en nuestro estudio tanto para el extracto de cuerpos fructíferos como de micelio. Por su parte Kim *et al.*, (2009) determinaron una actividad de captura del radical DPPH en un 84.4% en extractos etanólicos de *P. cornucopie*, 54.4% en *P. salmoneostramineus* y un 29.0 % en *P. ostreatus*. Estos valores son inferiores a los alcanzados en nuestro estudio. Se ha demostrado la existencia de una estrecha correlación de la polaridad del solvente de extracción y la inhibición del radical DPPH (Pattaraju *et al.*, 2006).

La actividad de captura del radical DPPH en extractos etanólicos del género *Pleurotus* sp. varía en dependencia del color presente en cuerpos fructíferos (Yan *et al.*, 2002). En *Ganoderma lucidum*, Norlidah *et al.*, (2011) reportaron una captura del radical DPPH significativa con una  $EC_{50}$  de 5.28 mg/mL, seguido de una mejor actividad de *Agrocybe* sp. y *Pleurotus eryngii* con valores de  $EC_{50}$  de 9.56 y 15.42 mg/mL

respectivamente. *F. velutipes* es la especie reportada con menor actividad de captura del radical DPPH, con un valor de 39.05 mg/mL. Según Mau *et al.*, (2005) en extractos acuosos obtenidos en caliente de *Ganoderma tsugae* demostraron una excelente actividad de captura del radical DPPH con valores bajos de EC<sub>50</sub> en un 0.30 y 0.40 mg/mL.

Algunos autores, consideran que existe una fuerte correlación entre la concentración de especies antioxidantes cuantificadas en forma de fenoles totales y la actividad antioxidante frente al radical DPPH (Pornariya y Kanov, 2009), mientras, otros autores refieren poca correlación entre estas dos variables (Czapecka *et al.*, 2005).

Las técnicas colorimétricas de cuantificación de fenoles (ensayo de Folin-Ciocalteu), no discriminan en la composición y estructura química de cada uno de los polifenoles; de manera que la actividad intrínseca individual; no se ve reflejada en los resultados, muestra las diferencias cuantitativamente o cualitativas de cada tipo de polifenol. Esto se pone de manifiesto, por ejemplo, en extractos con bajos niveles de fenoles que presentan una buena actividad antioxidante, debido a la actividad intrínseca de los componentes de la mezcla, mientras que otros, con elevada concentración, no resultan tan efectivos como cabría esperar (Escalona, 2011).

En nuestro trabajo, a las diluciones empleadas en el ensayo, la concentración de fenoles fue de 54 µg/mL en el extracto micelial (mejor actividad de captura del DPPH) y de 90 µg/mL en el de cuerpos fructíferos (menor actividad de captura). Es una regularidad de que extractos con elevados niveles de fenoles muestren buena actividad antioxidante (Jakamur *et al.*, 2011).

Se han obtenido correlaciones inversas entre el contenido de polifenoles, y la capacidad de captura del radical DPPH; lo que indica que los polifenoles no son los únicos responsables de la actividad antioxidante. Por ejemplo, se ha demostrado que la tioprolina, uno de los compuesto que se forman durante el tratamiento térmico de los hongos, tiene la propiedad de inhibir la formación de elementos N-nitrosos, el anión superóxido y el radical hidroxilo (Carolina *et al.*, 2004).

Distintos compuestos fenólicos pueden mostrar efectos notoriamente diferentes en su actividad antioxidantes, como resultado de interacciones sinérgicas, antagónicas y co-antioxidantes (Becker *et al.*, 2004). Por ello, se precisa estudiar en detalle el perfil de compuestos fenólicos de los hongos; de manera que se identifiquen y cuantifiquen las sustancias bioactivas. Aunque el contenido de extractos etanólicos y acuosos de hongos comestibles ha sido evaluado por diferentes autores, los estudios referentes al perfil de estos compuestos son escasos (Barros *et al.*, 2007 Barros *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2007; Ramirez *et al.*, 2007).

### **III.3.2 Captación de radicales 2.2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS).**

Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, lo que es de gran utilidad en estudios fitoquímicos simultáneos de varias plantas (Kuskoski *et al.*, 2005). Por ejemplo, Ozsoy *et al.*, (2009) refirieron valores de

captación del radical ABTS de 78.2% para un extracto de *Aloe vera* a concentraciones entre 60-80 mg/mL). Estos autores informaron niveles de inhibición de este radical del 99.4% para el  $\alpha$ -tocoferol a 1 mg/mL y 98.03% para el ácido ascórbico a 0.5 mg/mL de concentración. Este método ha sido también utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante de frutas nativas peruanas, los resultados de este estudio mostraron la existencia de una buena correlación con el ensayo de DPPH ( $r= 0,9765$ ), indicando que ambos métodos son practicables para la determinación de la capacidad antioxidante de las materias primas evaluadas (Repo *et al.*, 2008).

Las curvas de la captación del radical ABTS por los extractos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., se presentan en la Figura 2. Los valores de  $EC_{50}$  fueron estimados en función de las concentraciones de los extractos a las que se alcanza el 50% de la inhibición. El valor de  $EC_{50}$  resultó de 3.47 mg/mL en el extracto micelial, superior estadísticamente al mostrado por el extracto de cuerpos fructíferos (2.6 mg/mL,  $p<0.001$ ). Estos resultados sugieren una mejor actividad antioxidante para el extracto derivado de cuerpos fructíferos en el ensayo del secuestro de radicales ABTS Figura 3.

En extractos hidroalcohólicos de *Grifola gargar*, Bruijn *et al.*, (2008) demostraron una capacidad de captación de radicales ABTS de 90.9-93.3 mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/L. En la evaluación de la actividad antioxidante a través de los métodos DPPH y ABTS de un extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum* se encontraron valores de  $EC_{50}$  de 48.7 ppm y 15.5 ppm en el sub-extracto de acetato de etilo y 80.7 ppm y 19.2 ppm en el sub-extracto de diclorometano, respectivamente. Estos valores permiten considerar como promisorias las sustancias evaluadas (Zuluaga *et al.*, 2007). Por su parte, Choi *et al.*, (2006) reportaron una actividad secuestrante de radicales ABTS de 4.9 mg AAE referido a 100 g de cuerpos fructíferos de *Lentinus edodes*.

Adicionalmente, este método ha sido empleado en la evaluación de la actividad antioxidante de polisacáridos neutros de *Auricularia auricular* a concentraciones de 0.2 a 10.0 mg/mL. Los resultados evidenciaron que los derivados sulfatados resultaron superiores a los nativos en el ensayo de captación del radical superóxido, no así en las técnicas del ABTS, secuestro del radical hidroxilo y peroxidación lipídica (Zhang *et al.*, 2011).

El hecho de que, hasta el momento existen diferentes modos de expresión de los resultados del método ABTS publicados hace muy difícil la comparación de nuestros resultados con los datos bibliográficos. La forma más común de expresar los mismos es como equivalentes Trolox tras detener la reacción a un tiempo establecido (Villaño *et al.*, 2005).

Venkatakrishnan *et al.*, (2010) obtuvieron en extractos etanólicos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus florida*, valores de  $EC_{50}$  de 6.4 mg/mL. El por ciento inhibición del catión ABTS en extractos etanólicos de *Pleurotus ostreatus* fue de 13.23%, 65.21%, 87.74%, y 90.01% para las concentraciones de 100, 200, 400 y 800  $\mu$ g/mL respectivamente; obteniendo una  $EC_{50}$  de 2.0mg/mL, valor que resulta superior en cuanto a la

efectividad de captura del radical ABTS al obtenido en nuestro estudio, tanto para el extracto de micelio como de cuerpos fructíferos.

Jagadish *et al.*, (2008), obtuvieron un valor de EC<sub>50</sub> de 2.5mg/mL para *Agariscus bisporus* resultado similar al obtenido en nuestro estudio para el extracto de cuerpos fructíferos. A partir de un extracto etanólico de *Pleurotus djamor* informaron Miguel *et al.*, (2009) una captura del radical ABTS de EC<sub>50</sub> de 2.94 mg/mL. Valor superior al obtenido en nuestro estudio para el extracto de micelio.

La actividad antioxidante de extractos ricos en compuestos fenólicos comúnmente se correlaciona con el contenido de compuestos fenólicos totales, evaluados mediante el ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu. En nuestro trabajo, se demostró la existencia de una fuerte correlación entre la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante de captación de radicales ABTS ( $r = 0.9914$  para el extracto de micelio y  $r = 0.9572$  para el de cuerpos fructíferos) Figura 4. Ello se refleja en que las mayores concentraciones de fenoles se asocian a una mayor captación de radicales ABTS. Los modelos explican un 98.3 y un 91.6% de la variabilidad observada en (A) y (B), respectivamente. Yan *et al.*, (2006) demostraron como buena correlación de  $r^2 = 0.8181$  entre polifenoles y captura del radical ABTS para extractos acuosos de *Pleurotus cornucopie*.

### III.3.3 Determinación del Poder Reductor.

El método del poder reductor se basa en la capacidad de la sustancia 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 estudio. Se diferencian una de la otra principalmente en la fuente de  $Fe^{3+}$  que se adiciona al sistema (Moon y Shibamoto, 2009). El incremento de la absorbancia es proporcional a la cantidad de  $Fe^{3+}$  reducido a  $Fe^{2+}$  por la especie antioxidante evaluada. En el estudio se refirió el poder reductor como la concentración del extracto a la que se alcanza el 50% de la absorbancia máxima (EC<sub>50</sub>). 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 5. El valor de EC<sub>50</sub> resultó de 2.35 mg/mL en el extracto micelial, estadísticamente superior en comparación con el de cuerpos fructíferos (2.16 mg/mL,  $p < 0.05$ ). Estos resultados obtenidos en el ensayo de poder reductor sugieren una mejor actividad antioxidante para el extracto derivado de cuerpos fructíferos, como se muestra en la Figura 6. Por su parte, Lee *et al.*, (2007) reportaron en un extracto etanólico de *Pleurotus citrinopileatus* un valor de poder reductor de EC<sub>50</sub> de 1.05 mg/mL valor inferior para el extracto de cuerpos fructíferos y micelio obtenidos en nuestro estudio.

*Pleurotus ostreatus* posee excelentes propiedades antioxidantes en este sistema experimental (Lin, 1999). El poder reductor de los iones  $Fe^{3+}$  mostrado por los extractos de *Pleurotus* sp. podría guardar relación con la presencia de compuestos que

actúan como donadores de hidrógenos, como los fenoles, capaces de reducir iones metálicos o de reaccionar con radicales libres, seguido por la estabilización y terminación de la reacción en cadena mediada por el radical.

Bruijn *et al.*, (2009) mostraron valores del poder reductor en extractos acuosos de *Grifola gargal* de 135.6 mg, equivalentes al de ácido ascórbico (AAE)/L, que superan los alcanzados con etanol, acetona, acetato de etilo y n-hexano. Según Noorlidah *et al.*, (2011) se obtuvieron valores EC<sub>50</sub> para *P. Cystidiosus* de 0.043 mg/mL) *P. erengii* 0.165 mg/mL, *P. Flabellatus* 0.151 mg/mL y *P. Florida* 0.110 mg/mL. Kim *et al.*, (2009) refirió valores de EC<sub>50</sub> para *P. cornucopie* de 0.32 mg/mL en *P. salmonaostraminaus* 0.42mg/mL y *P. ostreatus* 0.5 mg/mL.

En este trabajo, se demostró la existencia de una correlación moderada entre la concentración de fenoles totales y el poder reductor ( $r= 0.8298$  para el extracto de micelio y  $r= 0.8176$  para el de cuerpos fructíferos), ver Figura 7. Ello se refleja en que las mayores concentraciones de fenoles se asocian a un mayor poder reductor. Los modelos explican un 68.8% y un 66.8% de la variabilidad observada en (A) y (B), respectivamente. La poca linealidad de los puntos, en el ensayo de actividad antioxidante del poder reductor es debido a que este mide la expresión de todos los compuestos reductores. Dentro de éstos no solo se incluyen los compuestos fenólicos, sino además otros compuestos que posean en su estructura dobles enlaces, los cuales son sitios activos de transferencia de electrones.

Se determinó una correlación de  $r=0.8546$  entre la concentración de fenoles totales y el poder reductor en extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus* (Noorlidah *et al.*, 2011). Valor similar al obtenido en nuestro estudio para el extracto de micelio y cuerpos fructíferos. Los extractos evaluados concentran a todos los compuestos activos en una única formulación, los cuales independientemente de su velocidad de reacción podrán interaccionar con el exceso de la especie  $Fe^{3+}$  existente en el medio. Se logra una actividad superior por la acción sinérgica de los diferentes compuestos activos. En esta acción sinérgica de los compuestos antioxidantes de igual y diferente polaridad química se basa la hipótesis antioxidante de los naturalistas que defienden el enfoque conocido como “Polymeal” (Wong *et al.*, 2006).

Este enfoque consiste en la aplicación de extractos totales (multicomponentes) en vez de fracciones élites aisladas, ya que al utilizar el extracto total, se emplearía todo el sistema del balance REDOX. Debido a la capacidad antioxidante/pro-oxidante de una sustancia, depende del entorno químico, con esta hipótesis naturalista se evitaría que uno o unos pocos componentes, por su marcado carácter antioxidante, pudieran en un medio adverso constituir especies pro-oxidantes. Ello ha sido informado para la quercetina y para las antocianinas (Wille *et al.*, 2003).

Se comprobó una buena correlación entre los resultados de los ensayos de captación de radicales ABTS y poder reductor con coeficientes de correlación ( $r$ ) de 0.89 y 0.924 para los extractos de micelio y cuerpos fructíferos, respectivamente. Ello indica que ambos métodos son practicables para la determinación de la capacidad antioxidante de las biopreparados evaluados

Figura 8.

### III.3.4 Inhibición de la peroxidación lipídica en membrana eritrocitaria.

Los estados fisiopatológicos mediados por EROs, son una consecuencia directa de sus interacciones con moléculas esenciales. Las EROs de alta reactividad pueden sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos y conducir a la reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica (POL). Las EROs provocan la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y de los fosfolípidos de membrana. Los procesos de POL conducen a la formación de numerosos derivados tóxicos: los hidroperóxidos, los 4-hidroxialquenos y el malonildialdehído (MDA), entre otros. El indicador de la POL más extensamente utilizado es el MDA, especialmente la determinación practicada mediante el ensayo espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (TBA) (León *et al.*, 2005).

Estudios recientes han detectado concentraciones elevadas de MDA en diversos estados fisiopatológicos, entre los que se destacan el infarto del miocardio, la *Diabetes Mellitus*, la enfermedad de Alzheimer, quemaduras y en la actividad física (Stephens *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2009; Fisher-Wellman y Bloomer, 2009). La peroxidación lipídica inducida por radicales libre trae como resultado la ruptura de la integridad de la membrana afectando su fluidez y permeabilidad (Vidovic *et al.*, 2010).

Elevadas concentraciones (1.0 mM) de metales de transición, promueven la autooxidación en diferentes membranas, especialmente en presencia de agentes reductores tales como el ascorbato o la cisteína (Lanio *et al.*, 1988). La incubación en nuestro estudio de una suspensión de membrana eritrocitaria de carnero con el sistema  $Fe^{3+}$  ascorbato condujo a la formación y propagación de radicales lipídicos y a la destrucción de los lípidos de la membrana, produciendo niveles elevados de MDA (identificado como el producto de la POL que reacciona con el ácido tiobarbitúrico) a partir de los 30 min de iniciada la reacción, como se muestra en la Figura 9. Se demostró que la adición a la mezcla, de los extractos de *Pleurotus* a la concentración de 10 mg/mL conllevó a una disminución notable en la formación de MDA, lo que se evidenció particularmente a partir de los 60 minutos.

Los extractos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* mostraron a los 90 y 120 min de iniciada la reacción de autooxidación de la membrana, valores estadísticamente similares en el por ciento de inhibición de la peroxidación (52% a los 120 min) Figura 10. A los tiempos de 30 y 60 minutos, el extracto de cuerpos fructíferos presentó un efecto más potente en la inhibición de la POL en comparación con el extracto micelial ( $p < 0.05$ ). Esto es debido principalmente a la presencia de los flavonoides en cuerpos fructíferos. Con respecto al ácido ascórbico se alcanzaron niveles de inhibición entre 82-93.3%, superiores a los obtenidos con los extractos de *Pleurotus* sp.

Los resultados de inhibición de la POL informados en nuestro estudio para extractos de *Pleurotus* superan los reportados por Palacios *et al.*, (2011) en un extracto metanólico de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* (36%, determinado en el ensayo de oxidación del ácido linoléico inducida con ABAT). Estos autores refirieron la mayor inhibición en los extractos de las especies silvestres *C. sibiricus* (74%) y *C. cornucopioides* (70%) y no encontraron correlación entre la extensión de la inhibición y el contenido de fenoles/flavonoides en los extractos.

Al estudiar las propiedades bioactivas del micelio del hongo medicinal *Leucopaxillus giganteus* obtenido en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno Barros *et al.*, (2007), informaron mejores valores de actividad antioxidante expresada como EC50 para los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica (en el sistema modelo - caroteno-linoleato), en comparación con los alcanzados en los ensayos de captación del radical DPPH y la inhibición de la hemólisis mediada por radicales peróxido. A diferencia de Palacios *et al.*, (2011) observaron una correlación significativa entre la inhibición de la LPO y el contenido de fenoles/flavonoides.

En extractos metanólicos, Lin en 1999 informó que hongos comerciales como *Flammulina velutipes*, *Pleurotus cystidiosus*, y *Lentinula edodes* inhiben la peroxidación lipídica, al igual que los extractos etanólicos de *Armillariella mellea*, *Daedalea dickinsi*, *Fomitella fraxinea* y *Pleurotus cornucopiae* (Kim *et al.*, 1999). Por el momento no se han encontrado evidencias concluyentes sobre la relación estructura actividad responsable de la actividad biológica de los flavonoides (Castañeda *et al.*, 2008).

A partir de una concentración de 10mg/mL el por ciento de inhibición de la peroxidación lipídica para *P. cystidiosus* 49.83 %, *P. eryngii* 47.86 %, *P. flabellatus* 50.09 % y *P. florida* 56.58 % (Noorlidah *et al.*, 2011). Valores similares al obtenido en nuestro estudio tanto para extractos de cuerpos fructíferos como micelio. En el caso de extractos acuosos de hongos comestibles-medicinales informaron una actividad moderada en la inhibición de la peroxidación lipídica en un 30.54 y 57.18%. Reportando como mejor compuesto, la quercetina y el ácido ascórbico con porcentajes de inhibición de 77.92% y 81.93% respectivamente. Valor del ácido ascórbico similar al por ciento de inhibición obtenido en nuestro estudio.

El mecanismo de acción de los flavonoides durante la peroxidación lipídica esta determinado a su poder de absorción en las membranas eritrocitarias a través de asociaciones polares con los fosfolípidos. Esta cubierta de flavonoides proporcionaría protección contra el daño oxidativo, limitando el acceso de los oxidantes a la bicapa y/o controlando la tasa de propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres, que se dan en el núcleo hidrofóbico de las membranas (Elmastas *et al.*, 2005). En particular los flavonoides pudieran afectar a la configuración de la membrana formando estructuras más compactas que limitarían el acceso a los prooxidantes (Elmastas *et al.*, 2005).

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes fundamentalmente caracterizada por la captura del radical hidroxilo y anión superóxido, implicados ambos en la iniciación de la peroxidación lipídica (Ungemach, 1987; Gardner, 1989; Hogg *et al.*, 1992). Solamente un número limitado de estudios sobre la acción de los flavonoides en el ámbito celular han sido reportados (Whally *et al.*, 1990; Nègre-Salvayre y Salvayre, 1992; Hakayama *et al.*, 1993).

La correlación entre el contenido polifenólico de extractos de hongos y la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica han dado resultados contradictorios. Esto ocurre por la presencia de compuestos de naturaleza no fenólica presentes en extractos

acuosos. Un ejemplo de esto se observa en *A. auricular-judae* y *Pleurotus. florida* con bajas concentraciones de polifenoles y remarcada actividad en la inhibición de la peroxidación lipídica. Esta actividad antioxidante puede ser atribuida a los polisacáridos que presentan efecto antioxidante, actividad reportada recientemente (Zeng *et al.*, 2010).

#### III.4 Consideraciones Finales.

Al menos, hasta donde ha sido consultado en la literatura especializada en el tema, es éste el primer trabajo que estudia con un enfoque comparativo la concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* de extractos hidrosolubles crudos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

En función de los resultados obtenidos, se puede asumir que el método de extracción utilizado en el trabajo (Morris *et al.*, 2011 para la obtención de un preparado inmunocéutico de *Pleurotus* sp.) resultó efectivo en la liberación de compuestos antioxidantes con una elevada capacidad secuestrante de radicales libres, conjuntamente con otras sustancias derivadas del micelio y cuerpos fructíferos. Adicionalmente, los componentes con potencial antioxidante para capturar EROs, como los fenoles y flavonoides, son predominantemente solubles en agua (Bruijn *et al.*, 2009).

El contenido de compuestos fenólicos resultó superior en el extracto de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. respecto al de micelio ( $1743 \pm 175$  vs.  $\mu\text{g/mL}$ ), se presenta el primero  $112 \mu\text{g/mL}$  de flavonoides. La actividad antioxidante de extractos ricos en compuestos fenólicos frecuentemente se correlaciona con los niveles de fenoles totales, que pueden actuar como inhibidores de radicales libres (interrumpiendo la cadena), descomponedores de peróxidos, inactivadores de metales y/o secuestradores de oxígeno (Dziezak, 1986). Sin embargo, los compuestos fenólicos individuales pueden diferir marcadamente en sus efectos antioxidantes como resultado de sinergismo, antagonismo, co-antioxidación y la presencia de “retardadores” de la oxidación (Becker *et al.*, 2004).

Por otra parte la presencia de diferentes minerales en la composición de los extractos y los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad enzimática antioxidante de extractos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 obtenidos a bajas temperaturas destaca su propiedad como cofactores enzimáticos. Por ejemplo la catalasa dependiente de Fe y la SOD dependiente de Cu y Zn, siendo a su vez estos minerales de mayor concentración en micelio y cuerpos fructíferos. La actividad de la catalasa y SOD en extracto obtenido a bajas temperaturas mostró valores de 11.58 UI/200g de biomasa y 8.84 UI/200g respectivamente (resultados no publicados).

La actividad antioxidante estimada a través de los ensayos de captación del radical ABTS y poder reductor resultó superior en el extracto de cuerpos fructíferos, donde se detectó el mayor contenido de polifenoles y fueron cuantificados los flavonoides. Ambos extractos exhibieron una actividad similar en el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica en membrana eritrocitaria, y sólo en el ensayo de captación de radicales DPPH el extracto micelial evidenció resultados superiores al de cuerpos

fructíferos. Resultado esperado a la selectividad de reacción del DPPH con relación al Poder Reductor y ABTS+ a diferencia de este último, el DPPH no reacciona con los flavonoides que no tienen grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contienen un solo grupo hidroxilo (Roginsky *et al.*, 2005).

Por lo que se refiere a la capacidad antioxidante de las muestras a investigar, Yoshida *et al.*, (1989) y Prior *et al.*, (2005) reportaron que algunas de ellas mantienen su orden relativo de capacidad antioxidante, mientras otras modifican considerablemente su reactividad dependiendo de con qué radical reaccionaran. Se precisa caracterizar en detalle el perfil de compuestos fenólicos de los hongos comestibles-medicinales con vista a la identificación y cuantificación de las sustancias activas. Aunque el contenido fenólico de estos organismos ha sido evaluado por diferentes autores (Barros *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2008; Palacios *et al.*, 2011), son escasos los estudios referentes al perfil de los compuestos fenólicos individuales.

Los constituyentes químicos de extractos acuosos obtenidos en calientes de diferentes especies de hongos han reportado un amplio espectro de compuestos con potencial antioxidante (Lee *et al.*, 2007). Ejemplos de estos como el ácido ascórbico, tocopheroles y  $\beta$ -carotenos los que se han reportado como compuestos antioxidantes naturales de los hongos comestibles-medicinales (Ferreira *et al.*, 2009). Siendo los mismos muy solubles en un solventes polares. A pesar de esto se han reportado en muy bajas concentraciones (Lee *et al.*, 2007). La posibilidad de contar con extractos acuosos que presenten varios compuestos con propiedades antioxidantes es más efectivo que compuestos aislados con propiedades antioxidantes debido a la interacción sinérgica, antagónica y co-oxidante de los mismos frente a diferentes especies reactivas (Biziulevicius, 2007).

Las evidencias experimentales obtenidas en la tesis demuestran el interesante potencial de los extractos acuosos de *Pleurotus* sp. 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.

En la actualidad, entre el 80 y el 85% de los productos que se comercializan a partir de los hongos comestibles-medicinales derivan de los cuerpos fructíferos (colectados en su hábitat natural o cultivado en instalaciones productivas). Sólo el 15% de los productos comprende extractos de micelio (Lindequist *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la producción de micelio para aplicaciones farmacológicas ha sido poco explorada, los resultados del presente trabajo relacionados con sus propiedades antioxidantes sientan bases para su aprovechamiento biotecnológico como recurso alternativo a los cuerpos fructíferos, en adición a los efectos inmunomoduladores previamente evaluados (Morris *et al.*, 2012).

Preparar o utilizar un preparado antioxidante en los alimentos debe ser seguro, efectivo a bajas concentraciones, sin olor indeseable, el sabor o el color, siendo estable a elevadas temperaturas y a la vez no volátil. Además la presencia y posible efecto

antagonista debe ser cuidadosamente considerado debido a que un antioxidante puede convertirse en pro-oxidante (Biziulevicius, 2007).

Teniendo en cuenta que la producción de micelio para aplicaciones farmacológicas ha sido poco explorada, los resultados del presente trabajo, relacionados con sus propiedades antioxidantes, sientan bases para su aprovechamiento biotecnológico como recursos alternativos a los cuerpos fructíferos, en adición a los efectos inmunomoduladores previamente evaluados.

La **importancia teórica** de esta tesis radica en el aporte de nuevos conocimientos sobre la composición química de cuerpos fructíferos y micelio de *Pleurotus* sp. Ofrece evidencias científicas que permiten justificar el empleo de formulaciones con actividad antioxidante.

Desde el punto de vista **práctico**, la investigación ofrece **aportes sociales y económicos**. El conocimiento de la composición química de *Pleurotus* sp., así como la evaluación experimental de su actividad antioxidante permite sustentar sobre bases científicas el empleo y consumo de esta seta comestible por la población, proponiendo una nueva alternativa para el tratamiento de las múltiples enfermedades asociadas al desbalance REDOX del organismo, con vista al mejoramiento de la calidad de vida de la población cubana. De este modo los extractos investigados poseen potencialidades interesantes como nueva fuente antioxidante natural para la industria farmacéutica.

#### IV Conclusiones

- 1) El procedimiento empleado para la obtención de extractos hidrosolubles crudos a partir del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., mediante tratamiento térmico de la biomasa celular, favoreció la liberación de compuestos fenólicos con una elevada capacidad secuestrante de especies reactivas de oxígeno, con valores de 38 y 58 mg/100 g, respectivamente. Se destaca además, la presencia en los extractos de una fracción significativa de minerales con acción moduladora en el balance REDOX.
- 2) Los extractos acuosos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. demostraron poseer propiedades antioxidantes según los diferentes ensayos a nivel de reacciones químicas. La captación del radical ABTS y el poder reductor resultaron superiores en el preparado de cuerpos fructíferos, sólo en el ensayo de captación de radicales DPPH el extracto micelial evidenció una mejor respuesta.
- 3) Los dos extractos hidrosolubles de *Pleurotus* sp. resultaron efectivos en la inhibición *in vivo* de la peroxidación lipídica en membranas eritrocitarias de carnero, lo que se reflejó en una menor producción del derivado tóxico malonil-dialdehído.

## V Recomendaciones

- 1) Profundizar en la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos de 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) 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.

## VI Referencias Bibliográficas

- Ahmad I, Aqil F, Owais M. Modern Phytochemistry Turning Medicinal Plants into Drugs. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006; 18 (14):233-245.
- Ali EM, Fazel NS, Mohammad NS. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasicum* Trautv at flowering stage. Phcog Mag. 2009; 1(6):435-439.
- Álvarez J. Evaluación de algunos efectos inmunofarmacológicos de extractos hidrosolubles crudos del micelio de *Pleurotus* sp. 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. 2009.
- Amin A, Hamza A. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: A possible role of DNA fragmentation. Toxicology. 2005; 208: 367 - 375.
- Ayman D. Production of Mushroom *Pleurotus ostreatus* in Egypt as a source of nutritional and Medicinal Food. World Journal of Agricultural Sciences. 2008; 1817:630-634.
- Barros L, Falcao S, Baptista P, Freire C, Vilas-Boas M, Ferreira I. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chem. 2008; 111:61-66.
- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira I, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, - carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chem. 2007; 103:413-419.
- Beck MA. Nutritional-induced oxidative stress effect on viral disease. Am. J. Clin. Nutr. 2000; 72:1676-1681.
- Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. European Food Research and Technology. 2004; 219:561-571.
- Beltrán MJ, Estarrón M, Ogura T. Volatile compounds secreted by oyster mushrooms *Pleurotus ostreatus* and their bacterial activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry (USA). 1997; 45(10):4049-4052.
- Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. Micol. Apl. Inter. 2001; 13(1):25-9.
- Bermúdez RC, García N. Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Cuba. Capítulo 27. Pp. 489-512. En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. (2010) ISBN 970-9752-01-4.

- Biziulevicius GA. Mushroom decoctions, a waste product of food processing may be a potentially valuable source of immunostimulatory and anticancer substances. *Medical Hypotheses*. 2007; 69(3):693-712.
- Bleys J, Miller E, Pastor-Barriuso R, Appel L, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84 (4):880–887.
- Bobek P, Ozdin L, Kuniac L. Influence of water and ethanol extracts of the oyster mushrooms *Pleurotus ostreatus* on sesum and liver lipids of the Syrian hamsters. *En: Nahrung*. 1993; 37(6):571-575.
- Bohi KM, Sabik K, Muzandu Z, Shaban M, Soliman M, Ishizuka A, Kazusaka S. Antigenotoxic effect of *Pleurotus cornucopiae* extracts on the mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA98 elicited by benzo(a)pyrene and oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells, *Jpn. J. Vet. Res.* 2005; 52: 163–172.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 1995; 28:25-35.
- Breene WM. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul, MN. *Journal of Food Protection*. 1990; 53(10):883-894.
- Bruijn J, Loyola C, Aqueveque P, Cañumir J, Cortéz M, France A. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargar* mushrooms. *Micología Aplicada Internacional*. 2009; 21 (1), pp. 11-18.
- Bruijn J, Loyola C, Aqueveque P, Cañumir J, Cortéz M. Influence of heat treatment on the antioxidant properties of *Grifota gargar* hydroalcoholic extracts. *Micología Aplicada Internacional*. 2008; 20(1), pp.27-34.
- Bruijn J, Loyola C, Aqueveque P, Cañumir J, Cortéz, M, France A.. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargar* mushrooms. *Micología Aplicada Internacional*, 2009; 21 (1), pp. 11-18.
- Byeon S, Lee E, Jaehwi L, Eunji L, Song Y, Hong E, Kee K, Young E, Jae Y. Functional activation of macrophages, monocytes and splenic lymphocytes by polysaccharide fraction from *Tricholoma matsutake*. *Archives of Pharmacal Research*. 2009; 32 (11):1565–1572.
- Cadavid J, Cardona C. Evaluación y optimización técnico económica de las instalaciones de un cultivo de hongos *Pleurotus ostreatus* utilizando como sustrato pulpa de café. Tesis de grado Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola. 75p. Calle, V.H. 1977. Subproductos del café. Cenicafé. *Boletín Técnico*. 1999; 6(8): 25-31.
- Cárdenas RN, Pedraza CJ. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*. 2006; 17(2):164-173.
- Carolina BS, Lilia SM, Lilia TL, Silvia LS. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles del hongo Shitake (*Lentino edodes*) tratado térmicamente. *Food Chem*. 2004; 81:249-255.

- Castañeda CB, Ramos LL, Ibáñez VL. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*. 2008; 8(1).
- Cederbaum AI, Yongke L, Defeng W. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. Review article. *Arch. Toxicol*. 2009; 83: 519–548.
- Chang ST, and Buswel JA, I. Mushroom nutraceuticals. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 1996; 12:473-476.
- Chaoui A, El Ferjani E. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biol*. 2005; 328:23–31.
- Chen JC, Fang D, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure–activity relationship. *Food Chem*. 2007, 104:132–139.
- Cheung LM, Cheung PCK. Mushroom extracts whit antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*. 2005; 89(3) 403-409.
- Chihara G. Manipulation of host defense mechanisms supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst*. 1993; 85(18):1483–1492.
- Chirinang P, Intarapichet KO. Amino acids y antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia*. 2009; 35(4): 326-331.
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shitake *Lentinus edodes* mushroom. *Food ehem*. 2006; 99:381-387.
- Clarke J. Mushrooms the new superfood. Mushroom bureau. [www. Mushroom-uk.com](http://www.Mushroom-uk.com). 2007.
- Combs CF, Gray WP. Chemopreventive Agents: Selenium. *Pharmacol. Ther*. 1998; 79: 179- 192.
- Czapecka E, Mareczek A, Leja M. Antioxiadant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chem*. 2005; 93:223–226.
- Dandrea GM. Use of antioxidants During Chemetherapya and Radiotherapy Should Be avoided. *Cancer J. Clin*. 2005; 55:319-321.
- Dziezak JD. Antioxidant-The ultimate answer to oxidation. *Food Technology*.1986; 40: 94.
- Ed. Díaz de Santos SA. APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Work Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). Edición en español del "Standard Methods", XVII Ed. 1992.
- Elmastas M, Isildak I, Turkekul O, Temur N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms, *J. Food Compo*. 2005.
- Escalona JC. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina

- complementaria. Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Farmacia. Universidad de Oriente. Cuba. 2011.
- Falandysz J. Selenium in edible mushrooms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol.* 2008; 26(3):256-99.
- Fengguo X, Jianhua F, Mei Z, Haibin T. Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of the Emerging Technologies*, 2011; 102: 28-234.
- Fernández MJ. Productividad de dos cepas comerciales del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en diferentes mezclas de sustratos lignocelulósicos. Proyecto de investigación Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias (inédito). 2000.
- Ferreira M, Greca M, Pessoa M, Hirdina R. Studies on the transformation of novel disazo dyes by laccase, *Process Biochemistry*, 2007; 37:581-587.
- Feyza O, Belma A. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food Chemistry*. 2011; 128: 613-619.
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history (a review). *Dyn. Med.* 2009; 8(1):1-25.
- Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(30): 18515-18517.
- García-Pajón CM, Collado IG. *Nat. Prod. Rep.* 2003; 20:426.
- Girgin F, Yildirim E. Anti-inflammatory effects of dietary antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 2004; 3:19-30.
- Guha G, Rajkumar V, Ashok Kumar R, Lazar M. Antioxidant Activity of *Lawsonia inermis* Extracts Inhibits Chromium (VI)-Induced Cellular and DNA Toxicity. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 57:56-64.
- Gutiérrez A. Evaluación de las propiedades inmunocéuticas de un suplemento nutricional de *Pleurotus* sp. en ratones tratados con ciclofosfamida. Tesis en opción al título de licenciado en Biología. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. 2010. Cuba.
- Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. Putative Mechanism for Anticancer and Apoptosis-inducing Properties of plant derived polyphenolic compounds. *IUBMB life.* 2002; 50:167-171.
- Halliwell BJ, Gutteridge MC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 280:1-8.
- Han RM, Tian YX, Liu Y. Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57:3780-3785.
- Hincapié JG. Fertilización mineral del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Tesis de grado Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 1993; 91.

- Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station Circular. 1990; 347:1-39.
- Hogg N, Darley-USmar VM, Wilson MT, Moncada S. Biochem. J. 1992; 281:419-424.
- Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA. Oxidative stress induced by environmental tobacco smoke in the workplace is mitigated by antioxidant supplementation. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1998; 7 (11):981-988.
- Iwalokun BA, Usen UA, Otumba A, Olukoya DK. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. African Journal of Biotechnology. 2007; 6 (15):1732-1739.
- Jagadish LK, Krishnan VV, Shebhagaramam R, Kaviyaran V. Comparatyve study, on the antioxidant, anticancer and antimicrobial proprety of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach before and after boiling. AFR.J. Biotechnol. 2009; 8(4):54-61.
- Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P. Antioxi-dant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl4-induced liver injury in rats. Food Chem Toxicol. 2006; 44:1989-1996.
- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. An extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, increases catalase gene expression and reduces protein oxidation during ageing in rats. Chinese Journal of Integrative Medicine. 2010; 8(8): 774-780.
- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. Exp Gerontol. 2007; 42:183-191.
- Jayakumar T, Thomas PA, Sheu PG. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. Food Research International. 2011; 44: 851 – 861.
- Juranek I, Besek S. Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury. Gen. Physiol. Biophys. 2005; 24: 263-278.
- Kang HU, Nam AHN, Xinlin Y, Lee Y. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. International Journal Cancer. 2002; 102:250-253.
- Kim DO, Lee CY. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2004; 44(4):253-273.
- Kim JH, Kim SJ, Park HR, Choi JI, Ju YC, Nam KC, Kim SJ, Lee SC. The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. Journal of medicinal Plants Research. 2009; 3(12):1016-1020.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation or biological Systems: oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reations, and Methods for their Quantification. Toxicol. Pathol. 2002; 30:620-650.

- Krieger A. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot.* 2005; 56(411):33746.
- Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Manzini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2005; 25(4):726-732.
- Lakshmi B, Ajith TA, Sheena M, Nidhi G, Janardhanan KK. Antiperoxidative, anti-inflammatory and antimutagenic activities of ethanol extract of the mycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in South India. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2003; 22:1-13.
- Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre P. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49(7):3341-3348.
- Lanio R, Álvarez V, Pérez P. Manual de prácticas de laboratorio de biomembranas 1988. Ed, Pueblo y Educación. La Habana. Cuba.
- Latif A, Hussain J, Hamayun M, Gilani SA, Ahmad S, Rehman G, et al. Secondary Metabolites from *Inula britannica* L. and Their Biological Activities (review). *Molecules.* 2010; 15:1562-1577.
- Lee YL, Huang GW, Liang ZC, Mau JL. Antioxidant properties of the extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *Food and Science and Technology.* 2007; 40(5):823-833.
- Lee YL, Yen MT, Mau JL. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chemistry.* 2007; 140(1): 1-9.
- Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life.* 2001; 52 (3-5):159-164.
- León OS, Martínez G, Candelario EJ, García I, Bilbao T, Ledesma L. Balance antioxidante-prooxidante: salud y enfermedad. (1ª. Ed.) La Habana: Ed, Félix Varela. 2005; 346.
- Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update. *Dig Dis Sci.* 2010; 55:560-578.
- Lim S, An L, Zhang H. Effects of polysaccharide from *Coprinus comatus* on activity of serum lysozyme in Kunming mouse. *Edible Fungi of China.* 2007; 20(4):36-8.
- Lim Y, Xiang H. Nematicidal activity of *Coprinus comatus*. List PH. Occurrence of ergothioneine in shaggy-mane, *Coprinus comatus*. *Acta Phytopathologica Sinica.* 2007; 35(5):456-458.
- Lin HC. Evaluation of taste quality and antioxidant properties of edible mushrooms. *Life Sci.* 2009; 84: 705-712.
- Lin JM, Lin CC, Chen MF, Ujiie T. Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma japonicum*. *Journal of Ethnopharmacology.* 1995; 47(1):33-41.
- Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int J Med Mushrooms.* 1999; 1:195-206.

- Liu GT. Pharmacology and clinical application of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr) P. Karst, species (Aphyllorphoricetidae) in China. IJMM. 1999; 1:63-67.
- Liu GT. Pharmacology and clinical application of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr) P. Karst and mycelium of *Ganoderma capense* (Lloyd) Teng (Aphyllorphoricetidae). IJMM. 1999; 1:217-222.
- Liu GT. Pharmacology and clinical application of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr) P. Karst, species (Aphyllorphoricetidae) in China. IJMM. 1999; 1:63-67.
- Liu GT. Usos Farmacológicos y clínicos de *Ganoderma*. Edited by S.T. Chang et al. The Chinese University Press, Hong Kong. Mushroom Biology and Mushroom Products. 1993; 8:267-273.
- Lo KM, Cheung PCK. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. Food Chemistry. 2005; 89: 533-539.
- Lu J, Pei H, et al., Carcinogenesis. 1996; 17:1903-1907.
- Luo H, Mo MH, Huang XW, Li X, Zhang KQ. *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematodes. Mycologia. 2004; 96(6):1218-1224.
- Manson M. Cancer Prevention-the Potential for Diet to Modulate Molecular Signalling. Trends MolMed. 2003; 9:11-18.
- Manzi P, Gambelli L, Marcon S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. Food Chemistry. 1999; 65: 477-482.
- Mattila P, Kähkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. J Agric Food Chem. 2001; 49(5):2343-8.
- Mau J, Lin H, Song S. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. Food Research International. 2002; 35: 519-526.
- Mau JL, Chao GR, Wu, KT. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001; 49: 5461-5467.
- Mau JL, Tsai SY, Tseng YH, Huang SJ. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae*. Food Science and Technology. 2005; 38 (6):589-587.
- Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potential. Altern Med Rev. 2001; 6(1): 48-60.
- Melin AM, Perromat A, Deleris G. Pharmacologic application of Fourier method for carbonyl assay. Methods in Enzymology. 2000; 233: 357 - 363.
- Miguel G, Never Z, Gilmar Gabriel S, Omar T, Alberto A. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. Rev.Bio.Agro. 2009; 2.

- Miles PG, Chang ST. *Biología de las setas*. Santafé de Bogotá D.C. World Scientific. 1999; 206.
- Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, Duran N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food. Chem.* 2003; 82:409–416.
- Mizuno T. Antitumor active substances of mushroom fungi. *Based Science and Latest Technology on Mushroom*. 1999; 25:121-135.
- Moon JW, Shibamoto T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agr. Food Chem.* 2009; 57 (5):1655–1666.
- Moreira P, Nunomura A, Castellani R, Zhu X, Perry G, Smith M. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007; 65 (7): pp. 631-41.
- Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Rodríguez, S. Procedimiento para la obtención de un preparado inmunocéutico de *Pleurotus* spp. Patente de Invención No. 23717 (Resolución 1754/2011) Ref: 2011/1337. 2011.
- Morris HJ, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Beltrán Y, Peñalver N, Bermúdez RC, García N, Gutiérrez A, Alcántara M, Álvarez, J, Perraud-Gaime, I, Tamayo V, Fong O. Evaluación de las propiedades inmunofarmacológicas de extractos acuosos obtenidos de setas comestibles *Pleurotus* sp. Informe Final del Proyecto Territorial adscrito al Programa de Desarrollo de Productos y Servicios de Salud. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. 2012.
- Mruthunjaya K, Hukkeri V. In vitro Antioxidant and free radical scavenging potential of *Parkinsonia aculeata* L. *Phcog Mag.* 2008; 4(13):42-51.
- Nada SA, Omara EA, Abdel-Salam OM, Zahran HG. Mushroom insoluble polysaccharides prevent carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology.* 2010; 48(11): 3184 - 3188.
- Navarro J, Obrador E, Carretero J. *Free Radical Biol Med.* 1999; 26:410-418.
- Noorlidah A, Siti MI, Norhaniza A, Adawiyah SS, Ben FL. Evaluation of selected Culinary-Medicinal Mushrooms for Antioxidant and ACE Inhibitory Activities. 2011; 960:385-397.
- Olin K, Shigenaga M, Ames B. *Proc Soc Exp Bio. Med.* 1993; 203:461-466.
- Ozsoy N, Candoken E, Akev N. Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol in *Aloe vera*. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2(2): 99–106.
- Palacios, Lozano M, Moro C, D'Arrigo M, Rostagno MA, Martínez JA. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry.* 2011; 128:674-678.
- Palozza P. Can beta carotene regulate cell growth by Redox mechanism. An Answer From Cultured Cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005; (1740):215-221.

- Pérez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. Tesis Doctoral. Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma de Madrid. 2011.
- Pérez VI, Bokov A, Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y. Is the oxidative stress theory of aging dead. Review article. *Bioch. Bioph. Acta*, 2009; 1790:1005– 1014.
- Pornariya C, Kanok OI. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia*. 2009; 35:326-331.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53 (10):4290-302.
- Puttaraju NG, Venkateshaiah SM, Dharmesh S, Somasundaram R. Antioxidant activity of indigenous edible mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(26):9764-9772.
- Qureshi GA, Parvez SH. (Eds.) *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. Elsevier press. 2007; pp 451–466.
- Racchi M, Daglia M, Lanni C, Papetti A, Govoni S, Gazzani G. Antiradical Activity of Water Soluble Components in Common Diet Vegetables. *J. Agric. Food. Chem.* 2002; 50: 1272-1277.
- Raha S, Robinson B. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25 (10):502-508.
- Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and cofactors. *Journal of Clinical Interventions in Aging*. 2007; 2(2):219-36.
- Rajeshwar Y, Senthil Kumar GP, Gupta M, Upal KM. Studies on *in vitro* antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. *European Bulletin of Drug Research*. 2005; 13:31- 39.
- Rathee JS, Birija S, Patro SM, Sunita G, Chattopadhyay S. Antioxidant Activity of Piper betel Leaf Extract and its Constituents. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54:9046-9054.
- Repo R, Encina CR. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Rev. Soc. Quím.* 2008; 74(2).
- Richling E, Hohn C, Weckerle B, Heckel F, Schreier P. Authentication analysis of caffeine-containing foods via elemental analysis combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry. *Food Res. Tech.* 2003; 216:544-548.
- Roginsky V. Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005; 414:261–270.
- Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J*. 2008; 31: 179–196.

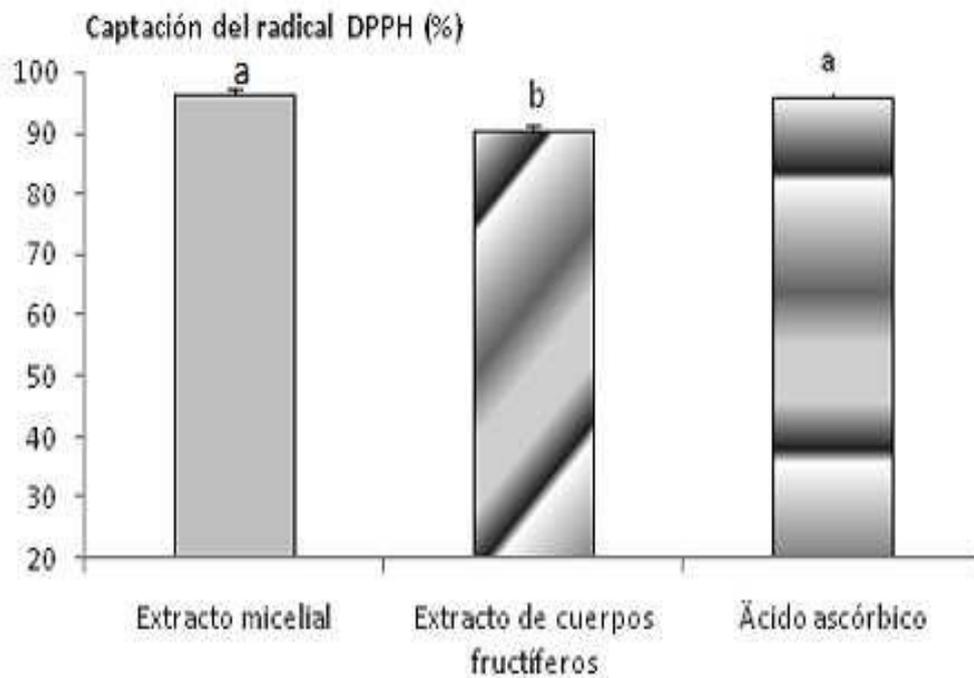
- Sánchez C, Pardo-Andreu GL, Philip SJ, Riaño S, Viada C, Núñez-Sellés A, Delgado R. *Mangifera indica* L. (Vimang) Protection against Serum Oxidative Stress in Elderly Humans. *Arch. Med. Res.* 2010; 37:158–164.
- Shi YI, James IFF, Benzie JA. Mushroom-derived preparation in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratogen. Carcin. Mut.* 2002; 22: 319-322.
- Shokuhin Kogy. Gakkaishi. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology. 1994; 41(6):419-424.
- Song YS, Kim SH, Sa JH, Jim C, Lim JC, Park H. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2003; 88(1):113-116.
- Sorensen JM. Herb-drug, Food-drug, Nutrient-drug, and Drug-drug interactions mechanisms. *J Altern. Complement. Med.* 2002; 8:293–308.
- Stephens J, Khanolkar M, Bain S. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2009; 202: 321–329.
- Sturion GL. Mineral composition of edible mushrooms cultivated in Brazil *Pleurotus* spp and other dehydrated species. *Arch Latinoam Nutr.* 2000; 50(1):102-108.
- Tsai Y, Huang J, Mau L. Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Food chemistry.* 2006; 98:670-677.
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Sixth Edition. Electronic release. And Publishing technology B.V. SL, USA. 2002.
- Venkatakrishnan V, Shenbhagaraman R, Gunasundaric D, Radhika K, Dandapani R, Loganathan K, Jagadish K. Antioxidante and antiproliferative effect of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Phytology.* 2010; 2(1):022-028.
- Vidovic SS, Mijuc IO, Zekovic ZP, Lepojivic ZD, Tumbas VT, Mujic AI. Antioxidant properties of selected *Boletus* mushroom. *Food Biophysics.* 2010; 5(1):49-58
- Wasser S, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.* 1999; 19(1):65-96.
- Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 60:258-274.
- Wasser SP Weis AL. Shiitake mushrooms *Lentinus edodes* (Berk.)Sing.]. In: Nevo E (ed) Medicinal mushrooms. 1997.
- Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 1999; 1(1):31-62.

- Wille JJ, Kydonieus A. Palmitoleic acid isomer (C16:16) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. *Skin Pharmacol. Appl. & Skin Physiol.* 2003; 16:176–187.
- Wong CC, Li HB, Cheng KW, Chen F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 2006; 97:705–711.
- Xie LP, Chen OX, Huang H, Wang HZ, Zhang, RQ. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry (Mosc).* 2003; 68: 487–491.
- Yang BK, Kim DH, Jeong SC. Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exopolymer produced from a submerged mycelial culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002; 66:937-942.
- Zamora ZB. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF $\alpha$ . Release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Med. Inflamm.* 2005; 30:16-22.
- Zeng RY, He RT, Wei et al., Antioxidant properties os polysaccharides from *Ganoderma sienesi* by diffident cultivations. *Food Science and Technology Research.* 2010; 16(2):143-148.
- Zervakis G, Balis C. Comparative study on the cultural characters of *Pleurotus* species under the influence of different substrates and fruiting temperatures. *Mexicana de Micología.* 2009. 11(7): 3448–3451.
- Zhang A, Fan J, Zhang J, Tang Q, Liu Y, Pan Y. Structural elucidation of a neutral fucogalactan from the mycelium of *Coprinus comatus*. *Carbohydr Res.* 2006; 341(9):1130-1134.
- Zhang H, Wang ZY, Yang X, Wang X, Zhang, Z. *In Vitro* Antioxidant Activities of Sulfated Derivatives of Polysaccharides Extracted from *Auricularia auricular*. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(5): 3288–3302.
- Zhou B, Zhong. Li L. Bioantioxidants : From Chemistry to Biology. *Pure Appl. Chem.* 2005; 1887-1903.
- Zuluaga J. New Lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *Journal of Natural Products.* 2005; 65:417–421.

**Tabla 1. Rendimiento de extracción y contenido de polifenoles y flavonoides en extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.**

Extracto	Rendimiento de extracción (%, w/w)	Polifenoles		Flavonoides	
		( $\mu\text{g/mL}$ )	(mg/100 g)	( $\mu\text{g/mL}$ )	(mg/100 g)
Extracto micelial	7	538 $\pm$ 148	38 $\pm$ 4.6	-	-
Extracto de cuerpos fructiferos	15.6	1743 $\pm$ 175*	58 $\pm$ 3.2*	112	3.6

(\*) Indica diferencias significativas en la prueba de la t de Student ( $p=0.001$ ).



**Figura 1. Actividad antioxidante frente al radical DPPH de extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.**

Los extractos de *Pleurotus* sp. fueron ensayados a la concentración de 1 mg/mL. Se utilizó el ácido ascórbico como control positivo.

Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

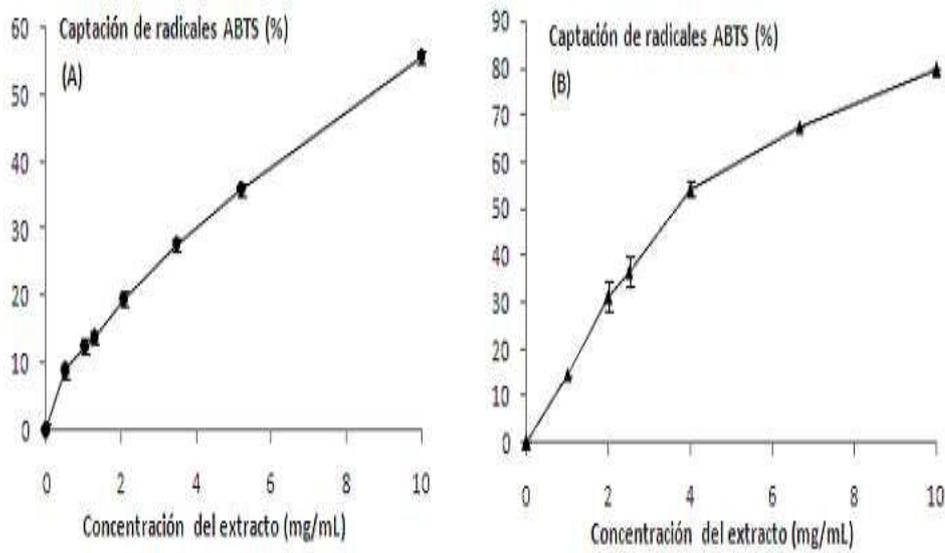


Figura 2. Actividad antioxidante de extractos acuosos de micelio (A) y cuerpos fructíferos (B) de *Pleurotus sp.* en el ensayo de captación de radicales ABTS.

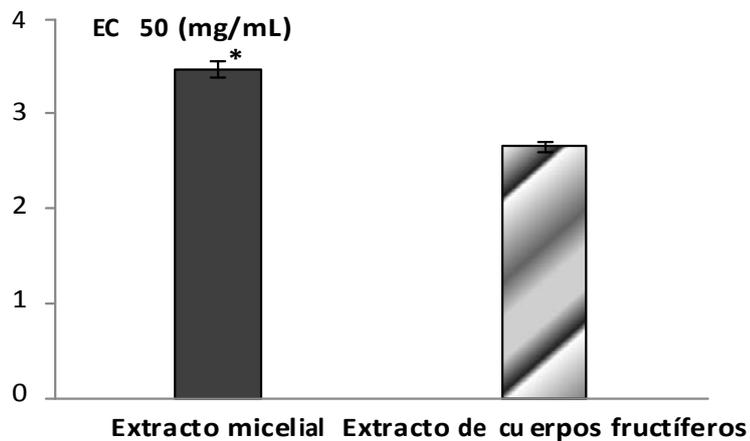
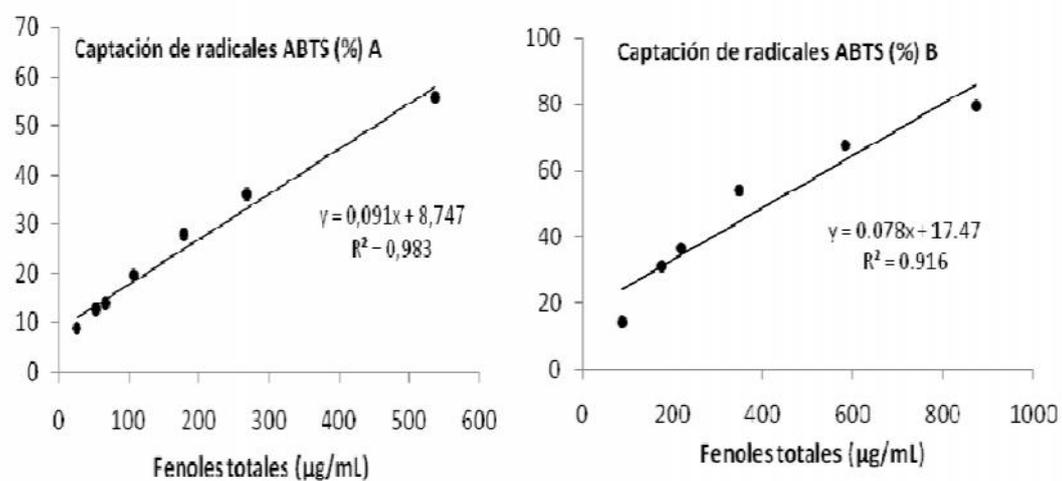


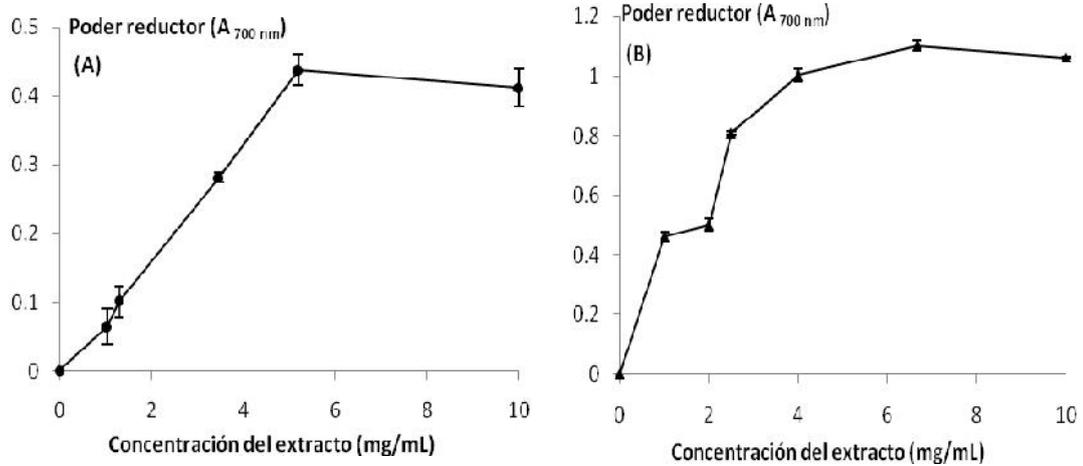
Figura 3. Valores de concentración de los extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.* a las que se alcanza el 50% de la inhibición máxima (EC<sub>50</sub>) en el ensayo de la captación de radicales ABTS.

(\*) Indica diferencias significativas en la prueba de la t de Student ( $p < 0.001$ ).

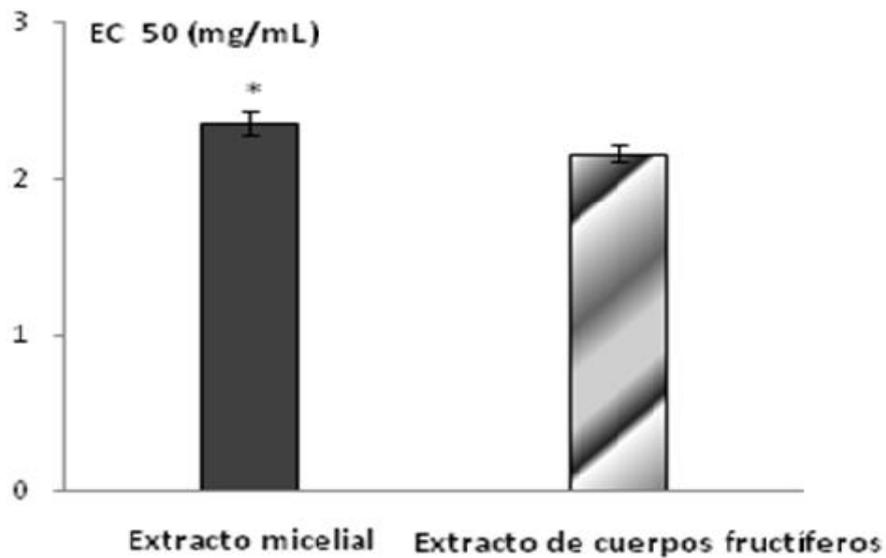


**Figura 4. Correlación entre la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante de captación del radical ABTS en los extractos acuosos de micelio (A) y cuerpos fructíferos (B) de *Pleurotus* sp. respectivamente.**

Se demostró la existencia de una correlación relativamente fuerte entre la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante de captación de radicales ABTS ( $r = 0,9914$  para el extracto de micelio y  $r = 0,9572$  para el de cuerpos fructíferos,  $p < 0,01$ ). Los modelos explican un 98,3 y un 91,6% de la variabilidad observada en (A) y (B), respectivamente.

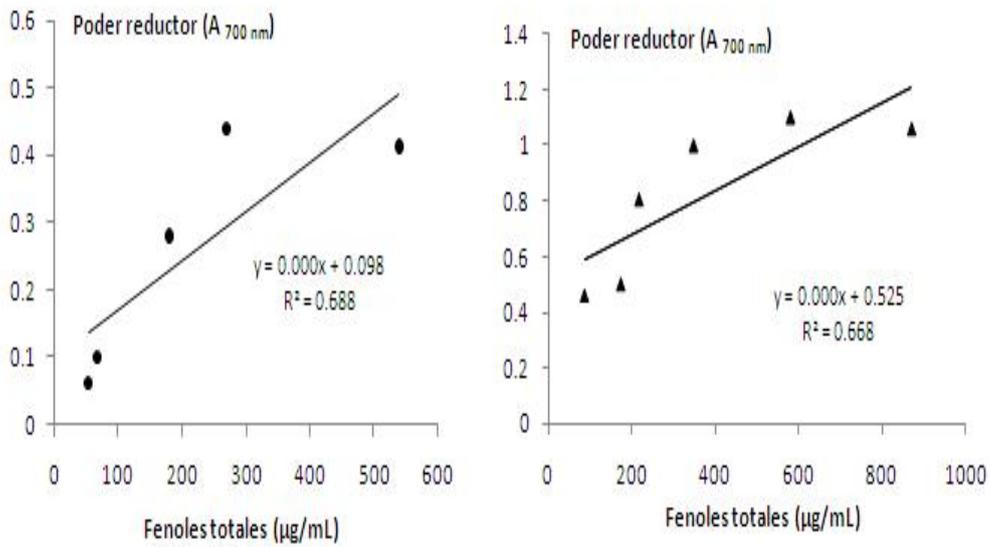


**Figura 5. Poder reductor de extractos acuosos de micelio (A) y cuerpos fructíferos (B) de *Pleurotus* sp.**



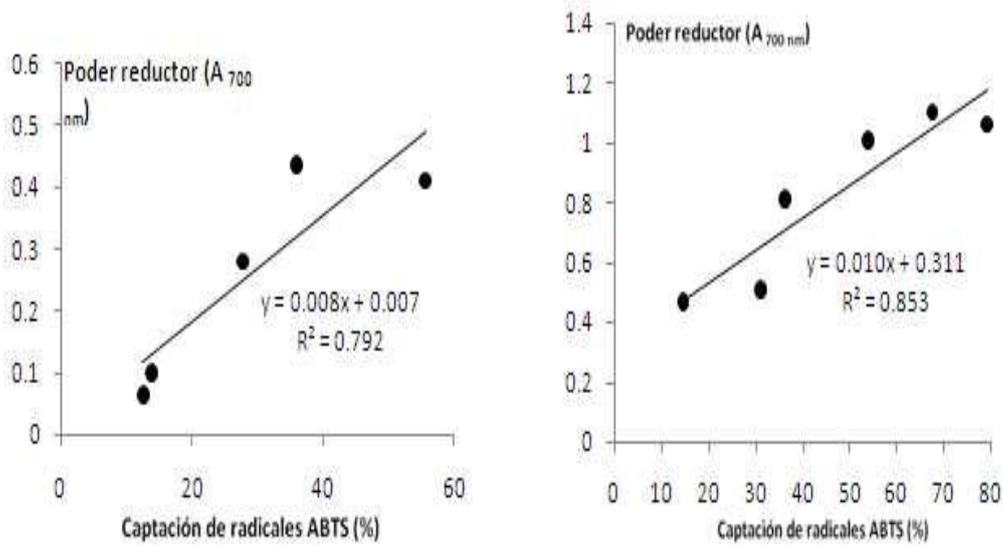
**Figura 6. Valores de concentración de extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. a las que se alcanza el 50% de la absorbancia máxima (EC<sub>50</sub>) en el ensayo de poder reductor.**

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



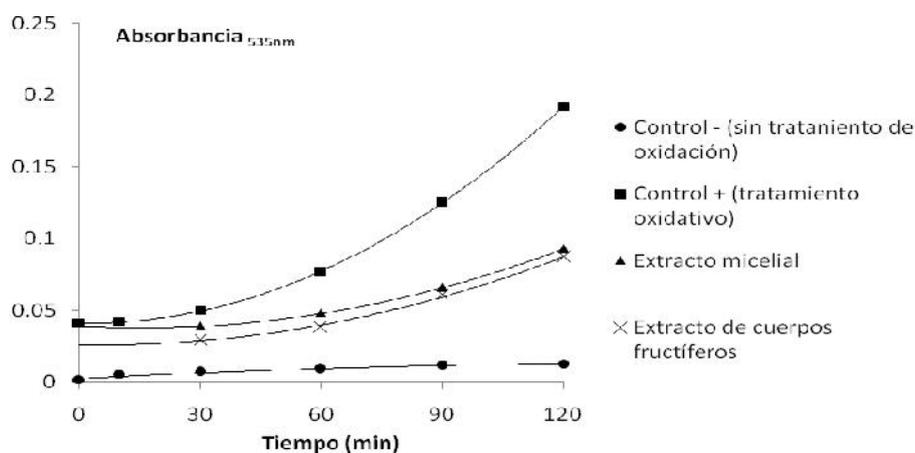
**Figura 7. Correlación entre la concentración de fenoles totales y el poder reductor en los extractos acuosos de micelio (A) y cuerpos fructíferos (B) de *Pleurotus* sp.**

Se demostró la existencia de una correlación moderadamente fuerte entre la concentración de fenoles totales y el poder reductor ( $r = 0,8298$  para el extracto de micelio y  $r = 0.8176$  para el de cuerpos fructíferos,  $p < 0.1$  en A y  $p < 0.05$  en B). Los modelos explican un 68.8 y un 66.8% de la variabilidad observada en (A) y (B), respectivamente.



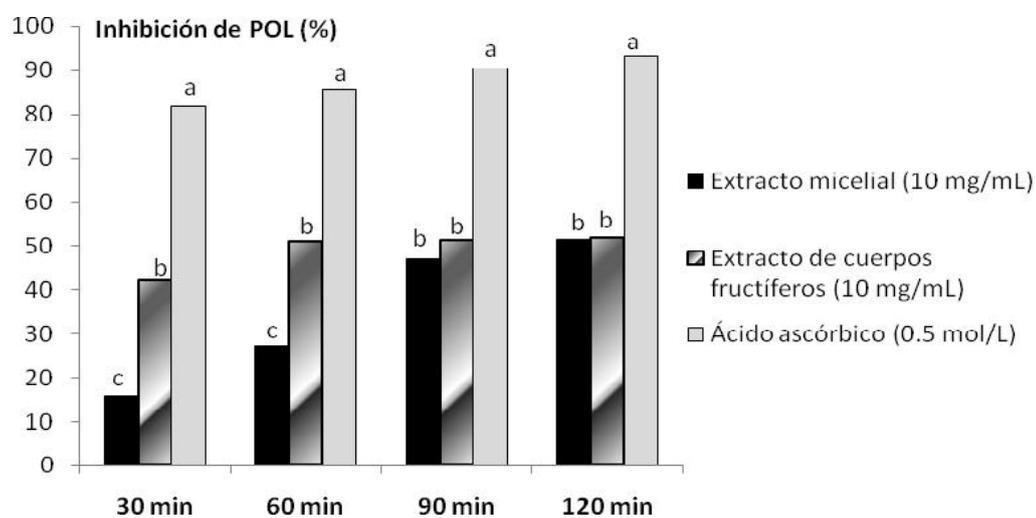
**Figura 8. Correlación entre los resultados de los ensayos de captación de radicales ABTS y poder reductor en los extractos acuosos de micelio (A) y cuerpos fructíferos (B) de *Pleurotus* sp.**

Se obtuvo una buena correlación entre los resultados de ambos ensayos con coeficientes de correlación ( $r$ ) de 0.89 y 0.924 para los extractos de micelio y cuerpos fructíferos, respectivamente. Los modelos explican un 79,2 y un 85.3% de la variabilidad observada en (A) y (B), respectivamente.



**Figura 9.** Actividad antioxidante de extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. (10 mg/mL) en el ensayo de inducción de la peroxidación lipídica en membrana eritrocitaria.

La extensión de la reacción de peroxidación se estimó a través de la formación de malonildialdehído (MDA) en la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA).



**Figura 10.** Inhibición de la peroxidación lipídica de la membrana eritrocitaria por extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. (10 mg/mL).

Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 3. Concentración de los diferentes elementos minerales presentes en extractos hidrosolubles de Cuerpos Fructíferos y Micelio de *Pleurotus* sp., determinado por espectrometría de plasma de acoplamiento inductivo (PAI).**

<b>Minerales</b>	<b>Micelio (g/200 g)</b>	<b>Cuerpos Fructíferos (g/200 g)</b>
<b>Ni</b>	<b>13.715</b>	<b>0.016</b>
<b>Co</b>	<b>5.830</b>	<b>0.016</b>
<b>Fe</b>	<b>15.715</b>	<b>0.462</b>
<b>Cu</b>	<b>0.835</b>	<b>0.118</b>
<b>Zn</b>	<b>6.500</b>	<b>0.502</b>
<b>Mn</b>	<b>1.345</b>	<b>0.084</b>
<b>Mg</b>	<b>---</b>	<b>0.038</b>

## Anexo

### **Mecanismos antioxidantes del organismo humano**

*Mecanismo preventivo:* En este mecanismo toman parte diversas proteínas, que poseen núcleos coordinados o con capacidad de enlace de metales, tales como la albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina, que poseen un núcleo central de cobre (Cu); y la ferritina, transferrina y mioglobina, que poseen un núcleo central de hierro (Fe). De esta manera se previene la formación de ERO muy dañinas, como por ejemplo, los radicales hidroxilo, a partir de otras moléculas. La deficiencia de algunas de estas proteínas en el organismo o de los metales Cu y Fe, alrededor de los cuales se forman dichos complejos de coordinación, o su alteración estructural por causas genéticas o fisiológicas, deja al organismo sin protección contra la sobreproducción endógena de ERO.

*Mecanismo secuestrador:* Consiste en la eliminación del exceso de ERO formadas en el organismo, lo cual puede lograrse por la acción de enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa y otras metaloenzimas o la presencia de entidades químicas con capacidad secuestradora de radicales libres, tales como los ácidos grasos polinsaturados, úrico y ascórbico (vitamina C), los tocoferoles (vitamina E), la bilirrubina, los carotenoides y flavonoides (Combs y Gray, 1998).

*Mecanismo reparador:* Constituido por enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de ERO, tales como la GPx, glutatión reductasa (GR) y metionina-sulfóxido reductasa (MSR). Dichas enzimas actúan como intermediarias en el proceso reparador del daño oxidativo, por el ataque de ERO producidas en exceso. Todo factor del medio que inhiba o modifique su actividad se convierte en una condición que favorece la aparición o el reforzamiento del estrés oxidativo. Ello requiere, por tanto, el conocimiento de la química de las enzimas reparadoras del daño oxidativo. Como ejemplo de esto podemos decir que se ha demostrado que el selenio (Se) actúa como un cofactor de la GPx; si el organismo tiene deficiencia de Se, las funciones de la GPx, se verán inhibidas y se favorece el daño oxidativo (Bray y Scoene, 2000). Por tanto, la suplementación con Se en esos casos debe constituir una alternativa terapéutica para disminuir el daño oxidativo y la progresión de la enfermedad.