



**FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES Y EXACTAS**

**Tesis presentada en opción al Título Académico  
de Máster en Biotecnología  
Mención Industrial**

**Título de la Tesis:**

**Evaluación *in vitro* e *in silico* de las propiedades  
antioxidantes de un extracto de *Pleurotus  
ostreatus***

*Autor: Lic. Usnavia Díaz Fernández*

*Tutor (es): MSc. Yaixa Beltrán Delgado  
Dr.C Gabriel Llauradó Maury*

*Consultante: Paul Cos, Ph. D*

2020

## **AGRADECIMIENTOS**

- ❖ A TODA MI FAMILIA, la mejor de todas, GRACIAS.
- ❖ Quisiera primero agradecer a mi tutora Yaixa, pues pasó de profesora a mi amiga, gracias por confiar en mí y por su infinita paciencia, GRACIAS.
- ❖ A mi amigo Juan Carlos por su ayuda en los experimentos, por su paciencia para explicarme muchas veces, por ayudarme a entender, MUCHÍSIMAS GRACIAS AMIGO.
- ❖ A mis nuevos amigos, Radamés, Yaneisy, Miladis, gracias por escucharme y por sus consejos.
- ❖ A mis compañeros de la 9<sup>na</sup> edición de la maestría en Biotecnología, en especial a Yany, Osmar, Argenis, Taimy, Lisset, Gyorkys, Yadira, hicimos un buen equipo.
- ❖ A los compañeros del CEBI que me permitieron ser uno más entre ustedes, en especial a Leonor, Morris, Serrat, Manolito, Migdalia, Kenia, Yamila, Odalis.
- ❖ A mis compañeros del departamento de Ciencias Básicas Biomédicas de la Facultad de Medicina No.2, por creer mi historia y ser pacientes, por fin terminé.
- ❖ A Isaac y Julio Rojas por su ayuda en el tema relacionado con el docking molecular.
- ❖ A mis amigas que me prestaron la computadora y darme la llave de su casa, pues sin ellas no hubiese podido terminar, Merci, Lilian y Olivia, no se imaginan cuanto les agradezco, gracias.
- ❖ A todo el claustro de la maestría en Biotecnología, gracias por adentrarme de nuevo en el mundo de la investigación, continúan siendo un faro para la educación y la investigación.
- ❖ A todos los que me apoyaron, sin ustedes el camino hubiese sido más difícil, en fin a TODOS, GRACIAS.

## RESUMEN

*Pleurotus ostreatus* es una de las especies de hongos comestibles-medicinales más consumidos en el mundo, no solo por su alto valor nutritivo, sino por la presencia de metabolitos de importancia farmacológica. En el presente trabajo se empleó un extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*. Se exploró el contenido fenólico a través de un tamizaje fitoquímico, espectro de absorción UV-visible y por HPLC, así como se determinó el contenido de fenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico y la actividad antioxidante mediante los ensayos de captación del DPPH•, estimación del poder reductor e inhibición de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón. Por otro lado, también se realizó la evaluación *in silico* de fenoles con la proteína CYP2E1. Los resultados mostraron que el procedimiento empleado mediante tratamiento térmico, favoreció la liberación de compuestos fenólicos. En general, el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico fue de  $106\pm 0,04\text{mg}/100\text{g}$ ,  $2,8\pm 0,92\text{mg}/100\text{g}$  y  $10,29\pm 1,6\text{mg}/100\text{g}$ , respectivamente. El extracto acuoso, además mostró actividad antioxidante *in vitro* a través de los ensayos realizados, pudiendo estar asociada a la presencia de compuestos fenólicos. El acoplamiento molecular arrojó parámetros químico-físicos de  $\Delta G$  y  $K_i$ , en un rango entre  $-8,05$  a  $-10,39$  kcal/mol y  $1,26\text{E}-8$  a  $355,69\text{E}-10$  M, respectivamente. Los fenoles con mejores resultados fueron los ácidos cafeíco, ferúlico, homogentísico, *p*-hidroxibenzoico y protocatecúico. Las evidencias obtenidas en el trabajo, sugieren que el extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* presenta potencial efecto antioxidante, pudiendo ser utilizado en futuras evaluaciones preclínicas y clínicas.

**Palabras clave:** actividad antioxidante, acoplamiento molecular, fenoles, *Pleurotus ostreatus*,

## ABSTRACT

*Pleurotus ostreatus* is one of the most consumed edible-medicinal mushroom species in the world, not only for its high nutritional value, but also for the presence of metabolites of pharmacological importance. In the present work an aqueous extract at high temperatures of fruiting bodies of *P. ostreatus* was used. The phenolic content was explored through a phytochemical screening, UV-visible absorption spectrum and by HPLC, as well as the content of total phenols, flavonoids, ascorbic acid and antioxidant activity was determined through assays of scavenging of DPPH•, estimation of the reducing power and inhibition of lipid peroxidation in liver and mouse brain homogenates. On the other hand, the *in silico* evaluation of phenols with the CYP2E1 protein was also carried out. The results showed that the procedure used by heat treatment favored the release of phenolic compounds. In general, the content of phenolic compounds, flavonoids and ascorbic acid was  $106 \pm 0.04 \text{ mg/100g}$ ,  $2.8 \pm 0.92 \text{ mg/100g}$  and  $10.29 \pm 1.6 \text{ mg/100g}$ , respectively. The aqueous extract also showed antioxidant activity *in vitro* through the tests performed, and may be associated with the presence of phenolic compounds. The molecular coupling yielded chemical-physical parameters of  $\Delta G$  and  $K_i$ , in a range between  $-8.05$  to  $-10.39 \text{ kcal/mol}$  and  $1.26 \text{E-}8$  to  $355.69 \text{E-}10 \text{ M}$ , respectively. The phenols with the best results were caffeic, ferulic, homogentisic, *p*-hydroxybenzoic and protocatechic acids. The evidence obtained at work suggests that the aqueous extract of *Pleurotus ostreatus* has a potential antioxidant effect, and can be used in future preclinical and clinical evaluations.

**Keywords:** antioxidant activity, molecular coupling, phenols, *Pleurotus ostreatus*,

## Índice

Introducción.....	1
Capítulo 1. Revisión bibliográfica. ....	3
1.1- Hongos basidiomicetos. Generalidades del género <i>Pleurotus</i> .....	3
1.2- Clasificación taxonómica e importancia del cultivo de <i>Pleurotus sp.</i> .....	4
1.3- Propiedades nutricionales y medicinales de <i>Pleurotus sp.</i> .....	5
1.3.1- Propiedades nutricionales.....	5
1.3.2- Propiedades medicinales.....	6
1.4- Radicales libres, especies antioxidantes y estrés oxidativo.....	8
1.5- Fenoles derivados de hongos comestibles medicinales.....	11
1.6- Citocromo P-450, su isoforma CYP2E1.....	12
1.7- Acoplamiento molecular.....	13
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	15
2.1- Cepa utilizada y condiciones de cultivo.....	15
2.2- Obtención del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CCEBI 3024).....	15
2.3- Determinación del contenido de materia seca del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CCEBI 3024).....	15
2.4- Determinación de los componentes micoquímicos del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	16
2.4.1-Tamizaje micoquímico.....	16
2.4.2- Espectro de absorción (200 - 800 nm) UV-visible del extracto acuoso de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	16
2.4.3- Análisis de compuestos fenólicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	16
2.4.4- Cuantificación de fenoles totales.....	17

2.4.5- Cuantificación de flavonoides.....	17
2.4.6- Cuantificación del contenido de ácido ascórbico.....	17
2.5- Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	17
2.5.1- Captación del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH•).....	17
2.5.2- Estimación del Poder Reductor .....	18
2.5.3- Evaluación del efecto del extracto acuoso en la inhibición de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón.....	18
2.5.3.1- Preparación de homogenatos de hígado y cerebro de ratón...	19
2.5.3.2- Cuantificación de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón.....	19
2.6- Relación de la composición fenólica con la actividad antioxidante del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	20
2.7- Evaluación <i>in silico</i> de compuestos fenólicos de <i>Pleurotus ostreatus</i> con la proteína CYP2E1.....	20
2.7.1- Recursos computacionales.....	20
2.7.2- Representación y optimización de la geometría de los fenoles.....	20
2.7.3- Preparación de la proteína CYP2E1.....	21
2.7.4- Identificación del sitio de unión.....	21
2.7.5- Preparación del centro Grid y acoplamiento molecular.....	21
2.7.6- Acoplamiento molecular de los fenoles con la proteína.....	21
2.8- Análisis estadístico.....	22
Capítulo 3. Resultados y discusión.....	23
3.1- Componentes micoquímicos del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	23
3.2- Análisis del espectro de absorción (200 – 800 nm) UV-visible del extracto acuoso de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	24

3.3- Identificación de compuestos fenólicos por HPLC .....	25
3.4- Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y ácido ascórbico en el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	27
3.5- Evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	31
3.5.1- Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH•).....	31
3.5.2- Estimación del Poder Reductor.....	34
3.5.3- Efectos del extracto acuoso de <i>P. ostreatus</i> en el modelo <i>in vitro</i> de peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón..	36
3.6- Relación entre el contenido fenólico con la capacidad secuestradora del radical DPPH•, el poder reductor y la peroxidación lipídica.....	38
3.7- Análisis del acoplamiento molecular de los fenoles con la proteína de estudio CYP2E1.....	39
Conclusiones.....	43
Recomendaciones.....	44
Referencias Bibliográficas.....	45

## **Glosario de términos**

ERO: Especies reactivas del oxígeno

GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

ADN: Ácido desoxiribonucleótido

RL: Radical libre

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

CYP-450: Citocromo P-450

MDA: Malondialdehido

DPPH•: Radical 2,2 difenil -1-  
picrilhidrazilo

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

Cys: Cisteína

Gln: Glutamina

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

His: Histidina

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

Lys: Lisina

Met: Metionina

Phe: Fenilalanina

Pro: Prolina

Ser: Serina

Thr: Treonina

Trp: Triptófano

Tyr: Tirosina

Val: Valina

TBARS: Sustancias reactivas al ácido  
tiobarbitúrico

TBA: Ácido tiobarbitúrico

POL: Peroxidación lipídica

$\Delta G$ : Energía libre de unión

Ki: Constante de inhibición

## Introducción

Los hongos comestibles son conocidos por su alto valor proteico, su contenido de vitaminas, minerales, fibra dietética, bajos niveles de sodio y grasas insaturadas (Maftoun y col., 2015; Piska y col., 2017; Muszynska y col., 2018). Esto los convierte en un excelente nutraceutico, ya que sus propiedades medicinales están directamente relacionadas con su contenido de compuestos bioactivos con potencial terapéutico (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014).

Numerosas propiedades medicinales han sido atribuidas a los hongos comestibles, al demostrarse que los mismos poseen efectos antitumorales, antioxidantes, antiinflamatorios, antivirales, inmunomoduladores, entre otros (Shamtsyan, 2016; Rathore y col., 2017).

*Pleurotus sp.* es uno de los géneros de hongos comestibles más popularmente cultivados y consumidos a nivel mundial (Royse y Sánchez, 2017). Destacan sus efectos antioxidante, antitumoral e inmunomodulador, los cuales se describen en extractos crudos y en compuestos obtenidos, tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos (Chang y Buswell, 2010; Morris y col., 2017). En este sentido, los hongos comestibles medicinales son considerados como alimentos funcionales y pueden ser consumidos para prevenir y tratar numerosas enfermedades crónicas, como el cáncer, la diabetes mellitus y los desórdenes neurodegenerativos (Patel y col., 2012; Yahaya y col., 2014).

Actualmente, la capacidad antioxidante de los alimentos está cobrando cada vez mayor importancia como medio para combatir el estrés oxidativo. El metabolismo celular produce de manera natural especies reactivas del oxígeno; cuando el mecanismo antioxidante no es capaz de detoxificar un exceso de estas especies, el resultado es el estrés oxidativo (Sánchez y Méndez, 2013; Patlevič y col., 2016). Incrementar la ingesta de antioxidantes ayudaría a proteger al organismo de los radicales libres y retrasaría el progreso de numerosas enfermedades crónicas. Existe una gran variedad de alimentos ricos en compuestos con reconocida actividad antioxidante, entre ellos, los hongos comestibles (Palacios y col., 2011).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los metabolitos secundarios antioxidantes más potentes presentes en los hongos comestibles-medicinales, evidenciada en las propiedades de inhibición de la peroxidación lipídica (POL), el secuestro de los radicales DPPH• y el poder reductor (Jayakumar y col., 2011). Además, pueden interactuar con proteínas involucradas en la cascada redox, pues de manera general, los compuestos bioactivos de los hongos, actúan sinérgicamente con los receptores de las membranas celulares para activar diversos eventos de señalización que conducen a una alta eficiencia y especificidad farmacológica (Muszynska y col., 2013).

Resultando importante evaluar las interacciones de los fenoles con determinadas proteínas de interés, a través de enfoques que permitan ahorrar tiempo y recursos materiales, con resultados efectivos y seguros. Para ello, se presenta el acoplamiento molecular, el cual es utilizado frecuentemente para predecir la orientación de los

enlaces de fármacos o sustancias candidatas con sus proteínas blancas, en aras de pronosticar la afinidad y actividad de la molécula. De ahí que el acoplamiento molecular juegue un rol importante en el diseño de fármacos (Abagyan y Totrov, 2001).

Al respecto, el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Universidad de Oriente ha desarrollado estudios *in vitro* e *in vivo* sobre determinadas actividades biológicas de la especie *Pleurotus ostreatus* (inmunomoduladora y antitumoral), sin embargo, no se han confirmado aún las estructuras químicas de los compuestos presentes en esta seta, ni se han completado los estudios de su potencial actividad biológica. En nuestro grupo de investigación en la actualidad, se necesitan evidencias experimentales que fundamenten la potencial actividad antioxidante de esta seta, como candidato futuro para el diseño de suplementos nutricionales y/o alimentos funcionales, útiles en las industrias médico-farmacéutica y alimentaria. Tomando en consideración estos elementos, la presente investigación pretende abordar el siguiente **problema de investigación**: Necesidad de evaluar a través de métodos *in vitro* e *in silico*, las propiedades antioxidantes de un extracto de la seta comestible *Pleurotus ostreatus*, para sustentar sus potenciales efectos farmacológicos.

## Hipótesis

Si los hongos comestibles-medicinales poseen actividad farmacológica, entonces es posible que un extracto acuoso de la seta *Pleurotus ostreatus* presente actividad antioxidante potencial en ensayos *in vitro* e *in silico*.

**Objetivo:** Evaluar a través de métodos *in vitro* e *in silico*, las propiedades antioxidantes de un extracto acuoso obtenido de *Pleurotus ostreatus*.

## Objetivos específicos:

- Explorar en el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, la presencia de compuestos fenólicos, a través de tamizaje fitoquímico, espectro de absorción UV-visible y la composición individual de los mismos por HPLC.
- Determinar fenoles totales, flavonoides y ácido ascórbico en el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* a través de los ensayos de captación del radical DPPH•, estimación del poder reductor e inhibición de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón.
- Evaluación *in silico* de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* con la proteína CYP2E1.

## Capítulo 1. Revisión bibliográfica

### 1.1- Hongos basidiomicetos. Generalidades del género *Pleurotus*

Los hongos basidiomicetos engloban aproximadamente un tercio de las especies de hongos (alrededor de 30.000 especies) (Kirk y col., 2008), son un grupo muy importante entre los hongos, pues tienen esencial participación en la naturaleza por la versatilidad de especies que lo constituyen dentro de ellos las especies comestibles.

Los hongos comestibles son ampliamente consumidos en el mundo hace miles de años por su excelente sabor, aroma y textura, el conocimiento de sus propiedades nutricionales, funcionales y medicinales data de cientos de años. Dentro de ellos encontramos uno los hongos comestibles más consumidos en el mundo, que comprende cerca del 40% de la producción y consumo mundial el *Pleurotus ostreatus* (hongo seta u ostra) (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014).

El género *Pleurotus* (Basidiomycota, Agaricales) fue definido por Paul Kummer en 1871. Es un grupo cosmopolita de hongos con alto valor nutritivo y numerosas propiedades terapéuticas, además de ofrecer una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y ambientales (Knop y col., 2015). Estos basidiomicetos comestibles se encuentran entre los más populares en todo el mundo, no solo por su elevado potencial productivo (Fernandes y col., 2015), como consecuencia de su corto ciclo de vida, la variabilidad de sustratos en los cuales puede crecer que incluyen desechos agrícolas e industriales, la baja demanda de recursos y tecnología que requiere, sino también por sus propiedades nutricionales, organolépticas y medicinales que los convierte en hongos nutraceuticos (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014).

El resurgimiento del interés en los productos naturales para el tratamiento de varios desórdenes fisiológicos ha potenciado el estudio de los hongos comestibles. En este sentido, el reconocimiento de numerosos compuestos modificadores de la respuesta biológica en las setas comestibles, conllevó a que fuese acuñado el término de *setas nutraceuticas* o *nutraceuticas*. Dicho término incluye extractos refinados o parcialmente refinados del micelio o cuerpos fructíferos de hongos comestibles, que se consumen como suplemento dietético y no como un alimento y poseen un alto valor terapéutico (Chang y Buswell, 2010).

A su vez, han clasificado al género *Pleurotus* dentro del grupo de los alimentos funcionales, producto al aislamiento y caracterización de numerosos compuestos bioactivos (Patel y col., 2012a; Yahaya y col., 2014). Los investigadores Morris y col., 2017 destacan que los productos con propiedades medicinales derivados de hongos se obtienen del cuerpo fructífero entre el 80% - 85% y solo el 15% de extractos del micelio.

Estas moléculas bioactivas incluyen polisacáridos ( $\beta$ -glucanos), enzimas, policétidos, ácidos grasos, polifenoles, esteroides, flavonoides, terpenoides, lectinas, alcaloides, entre otros (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014). La presencia de estos ha demostrado las propiedades medicinales que presentan como inmunomoduladores, la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares, antihipertensivas, el cáncer, exhiben

además propiedades antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, antibacterianas, antitumorales, hepatoprotectora, hipoglucémica, hipolipidémica, entre otras (Shamtsyan, 2016; Rathore y col., 2017).

## 1.2- Clasificación taxonómica e importancia del cultivo de *Pleurotus sp.*

La palabra *Pleurotus* deriva del griego "pleuro", que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo (Magdaleno, 2014).

*Pleurotus ostreatus* se encuentra clasificado taxonómicamente de la siguiente manera (Quevedo, 2016):

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

El género *Pleurotus* pertenece al grupo de las setas comestibles. La palabra *ostreatus* en latín quiere decir en forma de ostra, y en este caso se refiere a la morfología de sus cuerpos fructíferos, recibiendo también la denominación de hongo ostra u orellana (Pineda, 2014).

Los hongos del género *Pleurotus* son saprófitos degradan la madera contribuyendo de esta manera al reciclaje de nutrientes. Se consideran de pudrición blanca por degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa. Las especies de *Pleurotus* se adaptan con relativa facilidad a una gran cantidad de sustratos lignocelulósicos, y su capacidad para degradarlos está en función de la diversidad de enzimas que producen, principalmente hidrolasas que degradan la celulosa y la hemicelulosa, y oxidoreductasas que degradan la lignina (Royse y Sánchez, 2017).

La producción comercial de *Pleurotus sp.* se ha desarrollado gracias a que su cultivo es relativamente fácil pues no requiere de grandes insumos y el costo es bajo, alto grado de adaptabilidad al soportar un amplio rango de temperaturas y versatilidad para diferentes tipos de sustratos constituidos por residuos agrícolas y desechos agroindustriales como el bagazo de caña, rastrojos, pajas de cereales, pulpa y cascarilla de café, aserrín de madera, fibras de coco, entre otros, que obtienen un valor importante al ser utilizados en el cultivo de estos hongos. Además, las enzimas obtenidas durante la transformación de los residuos se han utilizado para diversos procesos, como la obtención de biofertilizantes, biopesticidas, etanol, saborizantes, metabolitos secundarios, biorremediación, entre otros (Mata y col., 2017).

*Pleurotus sp.* es uno de los grupos más importantes de hongos comestibles cultivados comercialmente, con una producción estimada de  $6.46 \times 10^9$  Kg que los posiciona en el segundo lugar a nivel mundial después de *Lentinula edodes* "shiitake" (Royse y col.,

2017). El 99% de la producción de *Pleurotus* se concentra en el continente asiático, especialmente en China. En Latinoamérica, la producción comercial se genera mayoritariamente en Brasil, México, Colombia, Argentina y Guatemala (Royse y Sánchez, 2017).

Existen descritas alrededor de 70 especies de *Pleurotus*, dentro de estas son cultivadas comercialmente debido a su elevado valor económico y sus propiedades nutraceuticas *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. eryngii*, *P. tuber regium*, *P. pulmonarius*, *P. djamor*, *P. cystidiosus*, *P. cornucopiae* y *P. ostreatus*. (Pérez-Martínez y col., 2015; Knop y col., 2015; Bellitini y col., 2019).

### **1.3- Propiedades nutricionales y medicinales de *Pleurotus sp.***

#### **1.3.1- Propiedades nutricionales**

*Pleurotus sp.* presenta propiedades nutricionales muy apreciadas, destacada por el bajo aporte calórico ( $1\ 510\ \text{kJ kg}^{-1}$ ) y elevado contenido de agua (80%-90%). Alto contenido de proteínas y fibra dietética, bajo aporte graso predominando las grasas insaturadas. Son fuente importante de vitaminas, minerales y bajos niveles de sodio convirtiéndose en un excelente nutraceutico (Valverde y col., 2015).

Tradicionalmente las investigaciones científicas se han centrado en las propiedades nutricionales de los hongos. En la última década, está cobrando más importancia el estudio de los compuestos biológicamente activos pues han demostrado que son los responsables de las propiedades medicinales que poseen los hongos. La concentración de éstos compuestos bioactivos dependerá de la variedad, composición del sustrato, condiciones del cultivo, almacenamiento y procesamiento de los hongos (Rathatore y col., 2017).

Existe un elevado número de reportes relacionados con la composición de *Pleurotus ostreatus* según las investigaciones de Carrasco-González y col., 2017 presenta entre un 7,3 - 53,3 g/100g de peso seco (DW) de proteínas, carbohidratos entre 13,1 – 85,8 g/100g DW, lípidos 0,5 - 7,6 g/100g DW, fibra cruda 7,6 – 15,0 g/100g DW y minerales 4 - 10 g /100g DW.

*Pleurotus* es una fuente importante de proteínas, presenta todos los aminoácidos esenciales, destaca la riqueza de arginina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico, así como del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la ornitina (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014), además la presencia de lisina y leucina no presente en la mayoría de los cereales consumidos por el hombre (Maftoun y col., 2015). Especie rica en polisacáridos con un 57% y un 14% de fibra dietética (Maftoun y col., 2015), dentro de estos los  $\beta$ -D-glucanos son considerados compuestos bioactivos con actividad antitumoral e inmunomoduladora (Oloke y Adebayo, 2015), encontrándose el “pleuran” que destaca por sus propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y anticancerígenas (Devi y col., 2015). Contiene bajos niveles de grasas, predominando los ácidos grasos insaturados que incluyen el 40% de ácido oleico y 55% de ácido

linoleico, con acción hipocolesterolémica (Maftoun y col., 2015; Piska y col., 2017). Presentan bajos niveles de colesterol, importante para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Piska y col., 2017).

Reservorio importante de vitaminas, principalmente del grupo B (B1, B2, B12), vitamina D y C (Corrêa y col., 2016). Elevado contenido de minerales como el potasio, fósforo, calcio, hierro, cobre, cinc, magnesio y selenio, esenciales para la síntesis proteica y como cofactores enzimáticos. Relativamente menor contenido de sodio constituyendo una opción para el control de la presión arterial (Piska y col., 2017; Muszynska y col., 2018).

### 1.3.2- Propiedades medicinales

Se le han atribuido numerosas propiedades medicinales a *Pleurotus sp.* constituyendo una fuente importante de compuestos bioactivos con propiedades anticancerígena, antihipertensiva, antiinflamatoria, antimicrobiana, antinociceptiva, antioxidante, antiviral, hipolipidémica, inmunomoduladora, entre otras. Estos compuestos incluyen polisacáridos, péptidos, proteínas, triterpenos, policétidos, nucleótidos (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014; Üstün y col., 2018).

Con respecto a la actividad **anticancerígena** se han descrito diversos extractos de *Pleurotus sp.* cuyo efecto es contrarrestar el crecimiento y/o proliferación de diferentes células cancerígenas, por ejemplo, triterpenoides obtenidos de extractos de *P. eryngii* inhibieron el crecimiento de células tumorales mamarias MCF-7 (Xue y col., 2015); el pleuroton B (sesquiterpenoide) aislado de *P. cystidiosus* induce la apoptosis en las líneas celulares prostáticas humanas DU-145 y C42B (Zheng y col., 2015). Asimismo, nanopartículas obtenidas de extractos de *P. djamour* mostraron efecto antiproliferativo en células de carcinoma de próstata, al disminuir la síntesis de ADN e inducir la apoptosis (Raman y col., 2015).

El potencial **antihipertensivo** se ha analizado en extractos de *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, *P. flabellatus*, *P. florida* y *P. sajor-caju* que muestran una elevada inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I en ratas (Abdullah y col., 2012), asimismo los extractos de *P. ostreatus* redujeron significativamente la presión intraocular en ratas (Ebigwai y col., 2012).

La actividad **antiinflamatoria** se ha observado en estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Extractos de *P. ostreatus* redujeron la producción del factor de necrosis tumoral alfa en macrófagos del modelo murino RAW264.7 (Gunawardena y col., 2014); asimismo extractos de *P. sajor-caju* administrado a ratas por vía oral disminuyó significativamente el edema plantar reduciendo así la inflamación crónica (Patel y col., 2012b). Numerosas especies de *Pleurotus* exhiben propiedades analgésicas, aislándose glucanos de *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii* y *P. djamor* con potente actividad antiinflamatoria y antinociceptiva en ratones (Glamočlija y Sokovic, 2017).

Con respecto a la actividad **antimicrobiana y antiviral** se han reportado extractos de *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii* y *P. citrinopileatus* que mostraron marcada actividad antibacteriana y antifúngica (Gogavekar y col., 2014), polisacáridos aislados de *P. eryngii* inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Li y Shah, 2014). La pleuromutilina, aislada de *P. mutilis*, es un metabolito con marcada acción antibiótica contra infecciones micoplasmáticas, empleado en la producción de medicamentos (Sun y col., 2017). Además, el peróxido de ergosterol aislado de *P. ostreatus* mostró un efecto antiparasitario contra *Entamoeba histolytica* (Meza-Menchaca y col., 2015). Además, extractos y polisacáridos aislados de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* mostraron actividad contra el virus del herpes simple tipo 2; la ubiquitina aislada de *P. ostreatus* inhibió la actividad del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Teplyakova y Kosogova, 2015), lectinas aisladas de *P. citrinopileatus* mostraron un potente efecto contra la actividad de la VIH-1 transcriptasa inversa (Hassan y col., 2015), así como lectinas aisladas de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* son empleadas como adyuvantes en vacunas de ADN contra la hepatitis B (Pérez-Martínez y col., 2015).

En cuanto a la actividad **hipoglucémica y hipolipidémica** polisacáridos aislados de *P. tuber-regium* administrados por vía oral a ratas diabéticas restauraron el perfil lipídico y los niveles séricos de glucosa e insulina (Huang y col., 2014). Los investigadores. Kanagasabapathy y col. 2014 mostraron resultados de actividad lipolítica de extractos de *P. sajor-caju* empleando la línea celular de adipocitos 3T3-L1; igualmente alimentaron ratas obesas con extractos de  $\beta$ -glucanos de *P. sajor-caju* obteniendo una disminución en el peso, en los niveles de triglicéridos en suero y en las enzimas hepáticas. El investigador Shamtsyan, 2016 sugiere incluir los extractos etanólicos de *P. ostreatus* dentro de las preparaciones terapéuticos para el control de la diabetes mellitus. La especie *Pleurotus* es reportada como una de las mayores productoras de estatinas de origen fúngico, para la producción de medicamentos, que no producen efectos secundarios, para el tratamiento de pacientes con arterioesclerosis, hipercolesterolemia y problemas cardiovasculares (Caglarirmak, 2011).

La actividad **antioxidante** de los hongos comestibles se ha asociado con la presencia de compuestos bioactivos como la ergotionina, el ácido gálico y ascórbico, los tocoferoles y el selenio así como con el contenido de polisacáridos y polifenoles presentes en los extractos (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014; Üstün y col., 2018).

Polisacáridos aislados de *P. tuber-regium* disminuyeron la hemólisis e inhibieron la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado de ratas (Wu y col., 2014). A su vez, estos compuestos aislados de *P. eryngii* administrados oralmente a ratas con hepatotoxicidad inducida con tetracloruro de carbono incrementaron la activación de la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa involucradas directamente en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (Jayakumar y col., 2011), relacionados con su actividad hepatoprotectora.

La actividad antioxidante de *P. sajor-caju* y *P. florida* en ratas con hipercolesterolemia prevé un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo (Khan y col. 2011).

Extractos de *P. ostreatus*, *P. cornucopiae* y *P. salmoneostramineus* inhibieron las células cancerosas del colon humano HT-29 asociadas con el envejecimiento (Kim y col., 2009). Se ha demostrado que existe un efecto clínico benéfico, en el tejido del hígado y del riñón de ratones con disfunción mitocondrial sujetos a estrés oxidativo, gracias al poder antioxidante de *P. ostreatus* (Naguib y col., 2014).

Con respecto al perfil **inmunomodulador** el género *Pleurotus* figura entre los más intensamente investigados como fuente natural de compuestos bioactivos, con demostrada actividad inmunoprotectora y moduladora de la recuperación inmunológica. Polisacáridos extraídos de *P. nebrodensis* incrementaron la fagocitosis en macrófagos RAW 264.7, con un aumento de la producción de interleucina 6, óxido nítrico, interferón gamma y el factor de necrosis tumoral (Cui y col., 2016).

Los investigadores Llauradó y col., 2015 al administrar a ratones irradiados el extracto micelial de *P. ostreatus*, en régimen profiláctico, obtuvieron un incremento en la maduración, diferenciación y proliferación de poblaciones celulares de las líneas mieloide y linfoide, dicha investigación aportó novedosas evidencias en cuanto al efecto radioprotector de los bioproductos de *Pleurotus sp.*

Diversos estudios *in vivo* sugieren que la actividad anticancerígena de *Pleurotus sp.* está estrechamente relacionada con la inmunomoduladora (Xue y col., 2015). El interés en explorar el efecto sinérgico de los micocompuestos presentes en *Pleurotus sp.* sobre la modulación de la respuesta inmune ha estimulado el estudio y el uso de extractos crudos, así como preparaciones secas en forma de polvos, cápsulas y tabletas (Deepalakshmi y Mirunalini 2014; Oloke y Adebayo, 2015). Diversas investigaciones con estos bioproductos han demostrado sus propiedades regenerativas a nivel celular, que atenúan los efectos secundarios derivados de los tratamientos convencionales contra el cáncer. Por ello, constituyen una excelente alternativa, procedente de productos naturales, para la recuperación de pacientes sometidos a regímenes agresivos de quimioterapia, radioterapia y cirugías mayores (Wasser, 2014).

#### **1.4- Radicales libres, especies antioxidantes y estrés oxidativo**

Los radicales libres (RL) se generan en los sistemas biológicos como resultado del metabolismo aeróbico celular normal o por factores exógenos como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el humo del tabaco, las drogas, aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Finkel y col., 2000).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, con una notable inestabilidad química y una reactividad elevada, que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena (Saavedra y col., 2010).

Tales especies pueden clasificarse según su núcleo funcional, el cual puede estar conformado por átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, hierro, cobre, entre otros; dando origen a diferentes tipos de especies reactivas, siendo las del oxígeno, las comúnmente formadas, debido a la participación de este elemento en el proceso aeróbico celular. (Hernández y col., 2019). No todas las especies reactivas que resultan de las reacciones del oxígeno son radicales libres, a las especies reactivas del oxígeno ya sean o no radicales libres se les llama especies reactivas del oxígeno (ERO) (Carrillo y col., 2016).

Dentro de las principales ERO encontramos los radicales libres anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) anión peróxido ( $RO_2^{\bullet}$ ), el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet-}$ ), alcoxil ( $RO^{\bullet}$ ) y el singulete ( $^1O_2^{\bullet\Sigma}$ ) y los no radicales libres como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipobromoso (HOBr), ácido hipocloroso (HOCl), el ozono ( $O_3$ ), peróxidos orgánicos (ROOH) (Hernández y col., 2019).

La mayoría de los tipos celulares son capaces de generar RL bajo determinadas condiciones, sin embargo, se generan fundamentalmente en células fagocíticas (Patlevič y col., 2016). A nivel subcelular en las mitocondrias es donde se genera una mayor producción, debido principalmente, a que cuenta con 11 sitios que pueden generar  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  (Saavedra y col., 2010; Patlevič y col., 2016; Hernández y col., 2019).

Las ERO tienen una participación dual en la célula, pueden adoptar un papel benéfico o perjudicial. Los efectos benéficos de las ERO se presentan a bajas concentraciones, siendo esenciales para varios procesos fisiológicos como la fosforilación de proteínas, la activación de factores transcripcionales, la diferenciación celular, la apoptosis, entre otras. Las ERO excesivas pueden afectar diversas funciones celulares al ocasionar daños a ácidos nucleicos, a proteínas oxidantes y causar la peroxidación lipídica o lipoperoxidación (Sánchez y Méndez, 2013; Patlevič y col., 2016). Existen evidencias que las ERO excesivas están implicadas en la incidencia y progresión de varias enfermedades como el cáncer, la diabetes, los trastornos metabólicos, la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares (hipertensión, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca crónica) y la neurodegeneración (Patlevič y col., 2016).

Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa, que incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo, mediante mecanismos que pueden ser preventivos, de reparación, mediante defensas físicas y el más importante que son las defensas antioxidantes (Sánchez y Méndez, 2013).

Para proteger a la célula en contra de los efectos de la oxidación, los sistemas de defensa antioxidante deben actuar en conjunto para formar un sistema íntegro en donde la dieta es la mayor fuente de antioxidantes y microelementos para la síntesis de enzimas antioxidantes. Las enzimas antioxidantes constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo, son muy rápidas en neutralizar, prevenir y/o

eliminar el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$ . Unido a éstas, existe una segunda línea de defensa compuesta por moléculas no enzimáticas que actúan mediante la donación de electrones a los RL, y ellos se convierten en nuevos RL pero con un menor efecto dañino o con una mayor facilidad de neutralización (Hernández y col., 2019; Sánchez, 2017a).

Al respecto los investigadores Ighodaro y Akinloye (2018) introducen además una tercera y cuarta línea de actividad antioxidante donde expresan que la tercera línea juega su papel después que el daño oxidativo se ha producido mediante la activación de enzimas *novo* capaces de reparar el daño causado a las biomoléculas y reconstituir la membrana celular dañada. Los ejemplos incluyen los sistemas de enzimas reparadoras del ADN, las enzimas proteolíticas que se encuentran en el citosol y en las mitocondrias de las células de mamíferos. La cuarta línea está relacionada básicamente con un mecanismo de adaptación, en el que se utilizan las señales requeridas en la producción y reacción de los RL para prevenir la formación o reacción de nuevo de dichos RL, o mediante la señal generada a partir del RL formado que induce la formación y el transporte de un antioxidante apropiado al sitio correcto.

En condiciones fisiológicas normales, siempre existe un equilibrio entre las ERO y las defensas antioxidantes para que los organismos se encuentren en las condiciones necesarias para la supervivencia y la salud del individuo (Carrillo y col., 2016).

El estrés oxidativo es un fenómeno fisiológico que se produce como resultado del desequilibrio entre los niveles de antioxidantes y oxidantes, a favor de los oxidantes que conllevan a una interrupción de la señalización y control redox y/o al daño molecular (Niki, 2016).

El estrés oxidativo, produce diversas formas de daño a las biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), estructuras y orgánulos celulares. Los perjuicios, implican la activación de los factores específicos responsables del daño oxidativo en la célula: la inflamación, la generación de compuestos mutagénicos, la promoción de la actividad aterogénica y la sobreexpresión de los genes oncogénicos (Rani y col., 2016). Ocasiona también, disfunción celular, pérdida de energía metabólica, disminución de la actividad biológica, alteraciones del transporte celular, de los procesos de señalización de la célula y de los ciclos de control, además de la activación de procesos inflamatorios e inmunitarios (Pisoschi y col., 2015). Estas acciones dañinas, pueden ser atenuadas por las sustancias antioxidantes, las cuales desempeñan un rol importante en el organismo.

El estrés oxidativo desencadena diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos implicados en la patogénesis de numerosas enfermedades como son el cáncer, la arteriosclerosis, el infarto de miocardio, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, el envejecimiento celular, entre otras (Patlevič y col., 2016).

No obstante, la efectividad de los sistemas antioxidantes se ve comprometida en el transcurso de la vida por lo que resulta de vital importancia la incorporación de

metabolitos con actividad antioxidante por medio de la dieta, moléculas capaces de actuar por sí mismas en la captación de radicales libres o de aportar en el aumento celular de antioxidantes endógenos (Obodai y col., 2014). En tal sentido las setas comestibles se alzan dentro de los alimentos de elección en los que abundan moléculas con capacidad secuestradora de radicales libres, pasando a formar parte de la amplia gama de alimentos con dicha capacidad como verduras, frutas, cereales o pescados. Se ha demostrado que un buen número de hongos comestibles podrían ser utilizados como antioxidantes naturales por su alto potencial frente al estrés oxidativo (Palacios y col., 2011; Peng y col., 2014).

Al revisar la composición química de los hongos comestibles, los compuestos fenólicos sobresalen como sustancias antioxidante predominantes, a estos se les unen además los flavonoides, las vitaminas como los tocoferoles, vitamina C y los  $\beta$ -carotenos (Myburgh, 2014; Deepalakshmi y Mirunalini, 2014; Oloke y Adebayo, 2015).

### 1.5- Fenoles derivados de hongos comestibles medicinales

Los **compuestos fenólicos** atraen la atención por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, entre otras (Anantharaju y col., 2016; Ferreira y col., 2017). Constituyen uno de los metabolitos secundarios antioxidantes más potentes (Kolayli y col., 2012). Son hidroxilados aromáticos que poseen uno o más anillos, con uno o más grupos hidroxilos, derivados de la L-fenilalanina. Ellos incluyen un largo número de subclases y gran diversidad de estructuras (Cote y col., 2010). Entre ellos se encuentran fenoles simples, ácidos fenólicos (derivados de los ácidos cinámico y benzoico), flavonoides, cumarinas, taninos condensados e hidrolizables y lignanos (Naczki y Shahidi, 2004).

Los **flavonoides**, son un grupo de polifenoles con diversidad estructural. Manifiestan una potente actividad antioxidante, así como antiinflamatoria (Vamanu, 2013). Los investigadores Arct y Pytkowska, 2008 refieren también que son ampliamente empleados en cosmetología para disminuir la irritación por su fuerte actividad antiedematosa. Numerosas investigaciones reportan que reducen la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y de enfermedades degenerativas (Vamanu, 2013).

La importancia que revisten estos compuestos se debe a que además de ser los metabolitos secundarios mayoritarios en los hongos (Ferreira y col., 2009), se encuentra la importante actividad antioxidante que presentan, la cual es debida a varios mecanismos como son atrapamiento de las ERO, inhibición de las enzimas responsables de la producción de RL como las oxidasas, la quelación de metales de transición involucrados en los procesos de formación de radicales libres y la prevención de los procesos de peroxidación por reducción de radicales peroxilo y alcoxilo. Esto se debe a que los grupos fenólicos poseen un alto potencial de reducción y pueden formar aniones radicales estabilizados por resonancia que aumentan la acción de atrapamiento de radicales libres (Cheynier y Halbwirth, 2017).

Unido a ello se ha comprobado que también estimulan enzimas con reconocidas propiedades antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, así como la regeneración de antioxidantes unidos a la membrana como el  $\alpha$ -tocoferol (Lushchak, 2014). Los mecanismos de acción de los flavonoides, como la modulación de las vías de señalización y la expresión génica, también podrían contribuir a las propiedades protectoras de los flavonoides. Además, los flavonoides pueden actuar como prooxidantes basándose en el número diferente de grupos hidroxilos y la presencia de iones metálicos transitorios (Kozarski y col., 2015).

### **1.6- Citocromo P-450, su isoforma CYP2E1**

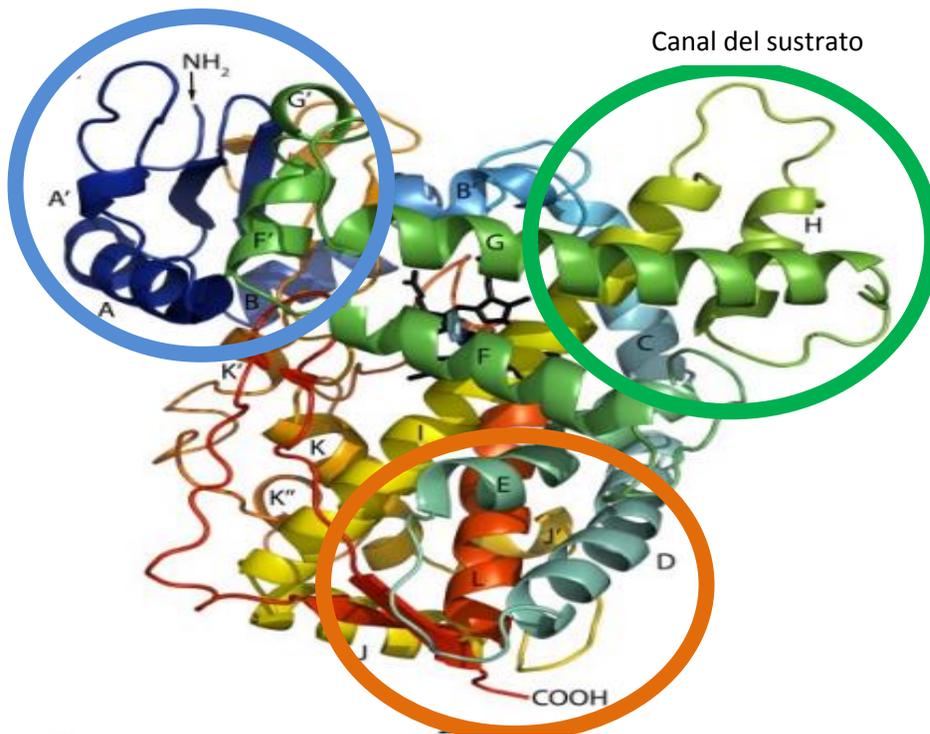
El citocromo P-450 (CYP-450) es un grupo de enzimas (hemoproteínas) con localización principalmente hepática que están implicadas en el metabolismo de la mayoría de los fármacos, así como de otros xenobióticos como las drogas, alcohol, pesticidas, pro-carcinógenos, anestésicos y sustancias endógenas como el colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroideas y ácidos grasos (Aubert y col., 2011).

Precisamente el hígado es un órgano de vital importancia, cuya función se centra en la eliminación de xenobióticos, la destrucción de las células sanguíneas remanentes y el reciclaje de sus constituyentes; así como en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, específicamente en la síntesis de proteínas plasmáticas. Daños ocurridos a nivel hepático conducen, en la mayoría de los casos, al estrés oxidativo, el cual es caracterizado por una evolución progresiva que comienza por esteatosis hasta hepatitis crónica, fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Grattagliano y col., 2009).

En la figura 1 se muestra la estructura terciaria del P450 que consiste en aproximadamente 12 alfa hélices, de las cuales las hélices I y L, son altamente conservadas y están en contacto directo con el grupo hemo. La zona del núcleo está constituida por cuatro alfa hélices, las hélices J y K, dos láminas beta, y una espiral denominada meandro o serpentina, esta zona abarca entre 7-10 residuos aminoácidos y se supone que juega un papel en la unión del grupo hemo, y en la estabilización de la estructura terciaria de la proteína (Williams y col., 2003; Miras y Gualix, 2009).

Además, en dicha figura se han destacado tres zonas, en primer lugar la porción del amino inicial con estructura predominante en hoja plegada, que se ancla en la membrana microsomal. Esta zona está espacialmente próxima al lugar de reconocimiento del sustrato formado por las hélices G-F. Muchos de los sustratos son de naturaleza hidrofóbica y necesitan incluirse en la membrana antes de ser reconocidos por el gran embudo hidrofóbico en esta zona de reconocimiento. La cisteína que da la quinta valencia de coordinación, ancla el grupo hemo y se encuentra antes del inicio de la hélice I, la cual contiene próxima al hemo una treonina que se requiere para transferir electrones en la reacción de hidroxilación. La zona de interacción con la reductasa es fundamentalmente hidrofóbica y suele ser una zona muy conservada en los diferentes citocromos (Williams y col., 2003; Villarejo, 2004; Miras y Gualix, 2009).

Interacción con membrana



Interacción con reductasa

**Figura 1.** Aspectos generales de la estructura terciaria de las proteínas CYP 450. Tomado de Miras y Gualix, 2009.

Dentro de este sistema enzimático merece especial atención el CYP2E1, que es una de las enzimas CYP más estudiadas tanto en animales como en humanos, debido no solo a su papel en el metabolismo del etanol y por su participación en la activación metabólica de una serie de pro-carcinógenos, sino por constituir una de las enzimas que produce mayor cantidad de ERO (anión superóxido y  $H_2O_2$ ), las que son formadas en presencia o en ausencia de sustrato y que serían las que posteriormente causarían daño tisular (Leung y Nieto, 2013).

Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han reportado que el aumento del CYP2E1 sería uno de los factores que causaría lipoperoxidación de las membranas hepáticas, producto a la capacidad para generar radicales libres (Orellana y Guajardo, 2004).

Existen variadas evidencias que muestran la participación del estrés oxidativo en numerosas condiciones clínicas y experimentales de la enfermedad hepática crónica de diversas etiologías, incluido el consumo de alcohol (Fernández y col., 2011; Leung y Nieto, 2013).

### **1.7- Acoplamiento molecular**

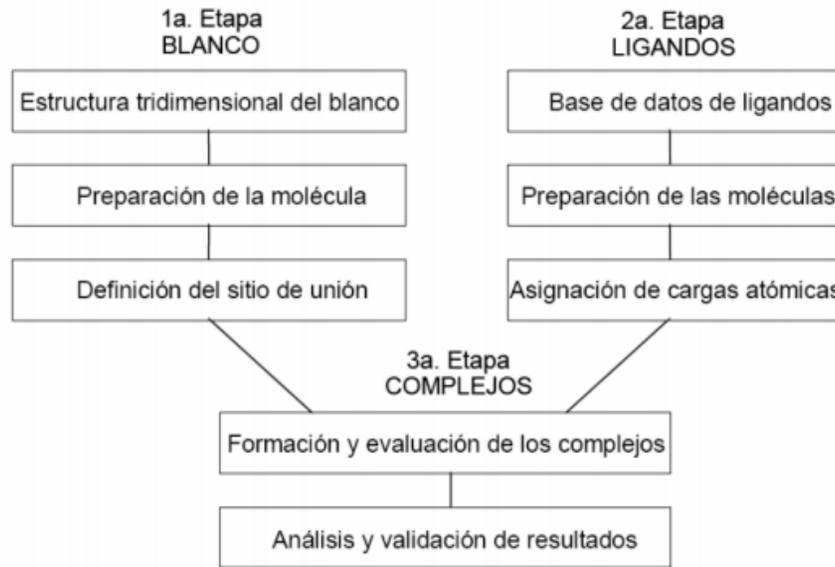
Docking es un método para predecir la orientación preferida de una molécula cuando se acopla a una segunda para formar un complejo estable. Este método es utilizado principalmente para predecir la orientación de enlace de pequeñas moléculas candidatas a fármacos con sus proteínas dianas y la afinidad y actividad de la pequeña molécula. Producto de esto, las técnicas de docking juegan un rol vital en el diseño racional de fármacos. El acoplamiento molecular es una herramienta computacional involucrada en el estudio de las estructuras moleculares de los fármacos, a través del reconocimiento molecular y que posee como bondades el hecho de poder predecir los modos de enlace y la afinidad de enlace de los complejos formados, por dos o más moléculas constituyentes con estructuras conocidas (Kitchen y col., 2004).

El objetivo principal del acoplamiento molecular es predecir con precisión la afinidad de un ligando confinado a un sitio de enlace receptor y estimar correctamente la fuerza del enlace. Un tipo importante de acoplamiento molecular es el acoplamiento proteína–ligando, debido a su relevancia terapéutica en el diseño moderno de drogas basadas en su estructura (Atkovska y col., 2014). En el acoplamiento molecular basado en las estructuras proteicas, cientos de posibles configuraciones son probadas y evaluadas; la configuración obtenida con el menor valor de energía es tomada como el mejor valor de acoplamiento (Froufe y col., 2011). En el esquema 1 se muestra de manera resumida la metodología fundamental para llevar a cabo un estudio de acoplamiento molecular (Padilla y Rojo, 2002).

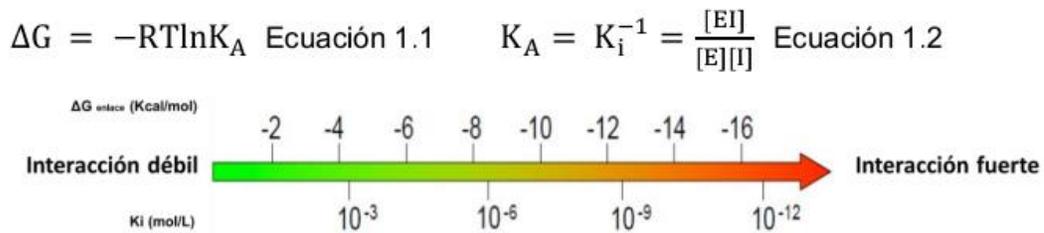
El objetivo de un programa de descubrimiento de fármacos es, generalmente, encontrar una molécula que se una a la proteína deseada, a bajas concentraciones. Cuando un fármaco tiene el valor de la constante de inhibición ( $K_i$ ) muy pequeño, indica que éste y su objetivo biológico se unen fuertemente. Valores ideales de  $K_i$  están en el rango de nanomolar (nM). Por otra parte, los valores de energía libre de unión ( $\Delta G$ ) en complejos

enzima-ligando, permiten evaluar si la modificación de un fármaco, aumenta o disminuye la afinidad con su objetivo biológico, estimando la estabilidad relativa de los diferentes compuestos. Estos parámetros químicos-físicos se relacionan de forma directa: a medida que la energía de unión disminuye, la constante de inhibición también decrece, lo cual se traduce en una mayor estabilidad del complejo enzima-ligando. Por otra parte, los cambios de entalpía ( $\Delta H$ ) y de entropía ( $\Delta S$ ), deben ser considerados en la evaluación de la energía de unión. Interacciones que son controladas por la entalpía que son los puentes de hidrógeno formados entre el ligando y la enzima, mientras que efectos hidrofóbicos controlan los cambios en la entropía (Orellana y Guajardo, 2004).

En la figura 2 se muestran las relaciones entre la  $K_i$  y el  $\Delta G$ , empleando las ecuaciones 1.1 y 1.2, donde  $[E]$ ,  $[I]$  y  $[EI]$  son las concentraciones de proteína, inhibidor y el complejo proteína-inhibidor, respectivamente; en tanto,  $R=8,314$  Jmol/K es la constante universal de los gases y  $T=298$  K es la temperatura.



**Esquema 1.** Etapas fundamentales para llevar a cabo un estudio de Docking molecular. Tomado de Padilla y Rojo, 2002.



**Figura 2.** Relación entre las magnitudes químico-físicas y la fortaleza de interacción del complejo enzima-sustrato. Tomado de Morales, 2019.

## Capítulo 2. Materiales y métodos

Las investigaciones se llevaron a cabo en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) y el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas (Universidad de Oriente) de Santiago de Cuba, así como el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de la Facultad de Farmacia, Ciencias Veterinarias y Biomédicas de la Universidad de Amberes, Bélgica.

### 2.1- Cepa utilizada y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* (CCEBI 3024), depositada en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI).

Los cuerpos fructíferos fueron obtenidos por fermentación en estado sólido (FES), utilizando como sustrato pulpa de café, previamente pasteurizada, bajo las condiciones de cultivo adecuadas, referidas por Bermúdez y col., 2001.

### 2.2- Obtención del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (CCEBI 3024)

Para la obtención del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, se utilizaron 500 g de cuerpos fructíferos, cortados en pequeñas piezas de 1 cm<sup>2</sup> a las que se adicionó 3 mL de agua destilada por cada gramo de biomasa. Se procedió luego a la extracción durante 8 h a 100 °C. Una vez fresco el extracto acuoso se filtró, utilizando una gasa estéril y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min en centrífuga (HealForce, modelo Neofuge 15). El extracto resultante se concentró a 100 °C hasta llegar a las 2/3 partes y luego fue conservado a 4 °C hasta el momento de la utilización.

### 2.3- Determinación del contenido de materia seca del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (CCEBI 3024)

La determinación del contenido de materia seca se realizó de acuerdo con los procedimientos referidos por la Asociación Oficial de Métodos Químicos Analíticos (2000). Se depositaron 3 mL del extracto acuoso en cápsulas de porcelana previamente taradas, para concentrar a sequedad se colocaron en una estufa a 105 °C durante 24 h, hasta mantener el peso constante. El contenido de materia seca se estimó mediante la ecuación 2.1

$$\% \text{ materia seca} = \frac{\text{Peso final de la cápsula} - \text{Peso inicial cápsula}}{\text{Volumen de muestra (mL)}} \times 100 \% \quad \text{Ecuación 2.1}$$

## **2.4- Determinación de los componentes micoquímicos del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus***

### **2.4.1-Tamizaje micoquímico**

La técnica del tamizaje fitoquímico (micoquímico cuando se refiere a muestras provenientes de hongos) es un ensayo cualitativo que se fundamenta en la realización de reacciones químicas con diferentes reactivos, donde la aparición o no de un determinado color o precipitado coloreado, es indicativo de la presencia de un metabolito. Para el tamizaje micoquímico del extracto hidrosoluble derivado de la seta *Pleurotus*, se utilizaron los ensayos descritos según Harborne (1984) y la “Guía Metodológica para la Investigación de las Plantas Medicinales” del MINSAP (1997). Entre los metabolitos secundarios ensayados de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* resultaron de interés para la investigación, la determinación de fenoles, taninos y flavonoides, empleando para fenoles y taninos el ensayo de cloruro férrico y para los flavonoides los ensayos de Shinoda, ácido sulfúrico concentrado, álcalis y Rosemheim. En este estudio se emplearon tres réplicas en cada ensayo.

### **2.4.2- Espectro de absorción (200 - 800 nm) UV-visible del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus***

El análisis UV-VIS fue medido en un espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer). El espectro de absorción del extracto acuoso a altas temperaturas de *Pleurotus ostreatus* fue medido entre 200 y 800 nm para caracterizar los compuestos fenólicos.

### **2.4.3- Análisis de compuestos fenólicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La muestra se analizó mediante HPLC en un sistema de la serie Agilent 1200 con desgasificador, bomba cuaternaria, inyección automática, compartimento de columna termostática y un detector de red de diodos (DAD) (Agilent Technologies, Eindhoven, Netherlands). Se usó una columna Gracesmart C18 basada en sílice (250 × 4,6 mm, 5 µm) (Grace Vydac, EE. UU) junto con una precolumna adecuada utilizando gradiente estándar de acetonitrilo (ACN) / H<sub>2</sub>O, con un rango de 5% de acetonitrilo (ACN) a 100% en 60 min a una velocidad de flujo de 1 mL / min. La muestra se preparó a una concentración de 1 mg / mL en metanol al 50%. Los gradientes estándares a una absorbancia de 280 nm, fueron los siguientes:

Tiempo (min)	% solvente B (ACN)
0-5	5
45-50	100
55-60	5

#### **2.4.4- Cuantificación de fenoles totales**

La determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo según la metodología de Slinkard y Singleton, 1977. Se tomaron 250  $\mu$ L de las diluciones del extracto acuoso (200-800  $\mu$ g/mL) y se les añadió 250  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu al 10%, dejándolos reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 250  $\mu$ L de una solución saturada de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 10%. Se preparó una solución blanco con agua destilada y reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 1 h de reposo en cuarto oscuro, se determinó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (T60 UV-Visible Spectrophotometer), y se utilizó una curva de calibración realizada con ácido gálico ( $y=0,0059x-0,031$ ,  $R^2=0,9998$ ). Los resultados fueron expresados como mg en equivalentes de ácido gálico por 100 g de extracto.

#### **2.4.5- Cuantificación de flavonoides**

La determinación del contenido de flavonoides se realizó según Jia y col., 1999. Se tomaron 250  $\mu$ L del extracto acuoso, el cual fue mezclado con 1,25 mL de agua destilada y 75  $\mu$ L de una solución al 5% de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ). Luego de 5 min fue añadida a la mezcla 150  $\mu$ L de una solución acuosa de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 10%. Después de transcurridos 6 min se añadió 500  $\mu$ L de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ , 1 M) y 275  $\mu$ L de agua destilada. Se preparó una solución blanco con agua destilada,  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{NaNO}_2$ . La solución se mezcló y se leyó a 510 nm en un espectrofotómetro UV-visible (T60 UV-Visible Spectrophotometer). Se utilizó catequina para la curva de calibración ( $y=0,9629x-0,0002$ ;  $R^2=0,9999$ ). Los resultados fueron expresados como mg en equivalentes de catequina por 100 g del extracto en seco.

#### **2.4.6- Cuantificación del contenido de ácido ascórbico**

El contenido de ácido ascórbico se determinó por el método de Klein y Perry (1982). 100 mg de polvo seco del extracto acuoso, se mezclaron con 10 mL de ácido metafosfórico (1%) y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min. Luego el extracto se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 min a 20  $^{\circ}$ C en centrífuga (HealForce, modelo Neofuge 15). Posteriormente se filtró en papel de filtro. Luego se mezcló 1 mL del filtrado con 9 mL de 2,6-diclorofenolindofenol (0,2 mM), posteriormente se incubó durante 30 min y se leyó la absorbancia a 515 nm en espectrofotómetro UV-visible (T60 UV-Visible Spectrophotometer). El contenido de ácido ascórbico se calculó usando una curva de calibración de ácido L- ascórbico ( $y= 3,4127x-0,0072$ ;  $R^2= 0,9905$ ). Los resultados fueron expresados en mg de ácido ascórbico por 100g del extracto.

### **2.5- Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus***

#### **2.5.1- Captación del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH•)**

La capacidad de las muestras para captar radicales libres se midió con el método DPPH• (Brand-Williams y col., 1995). El DPPH• es un compuesto cromógeno que simula una especie reactiva de oxígeno en términos de donación del radical hidroxilo. El método consiste en la capacidad del radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) que es

de color azul-violeta y tiene un electrón desapareado, de decolorarse a amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante.

Se preparó una solución patrón del radical libre DPPH• (0,1 mM, en etanol al 95%), en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio. Luego a 1mL de los extractos a diferentes concentraciones (0,25 - 1 mg/mL), se adicionó 0,5 mL de la solución etanólica de DPPH. La mezcla se agitó con vórtex (Heidolph REAX2000) y fue mantenida en la oscuridad por 20 min. Posteriormente se procedió a leer la absorbancia en espectrofotómetro UV-visible (T60 UV-Visible Spectrophotometer) a 517 nm, contra un blanco. Se utilizó el ácido ascórbico como sustancia de referencia. La capacidad de secuestro del radical se determinó por el cálculo del porcentaje de captación del radical libre DPPH• mediante la ecuación 2.2:

$$\% \text{ de captación del DPPH} \bullet = \frac{AD_{DPPH} - A_M}{AD_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde:

$A_{DPPH}$  = Absorbancia del DPPH o control (contiene todos los reactivos excepto la muestra).

$A_M$  = Absorbancia de la muestra.

Además, fue estimada la capacidad antioxidante ante este radical en función de la concentración del extracto a la que se alcanza el 50% de la inhibición máxima ( $EC_{50}$ ).

### 2.5.2- Estimación del Poder Reductor

A 2,5 mL de cada una de las diluciones del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* (0,25 -1 mg/mL) según el método de Oyaizu, 1986, se les agregó 2,5 mL de buffer fosfato de potasio (0.2 M, pH 6.6) y 2,5 mL de ferricianuro de potasio [ $K_3Fe(CN)_6$ ] al 1% W/V en agua. Posteriormente la mezcla se mantuvo a 50 °C por 20 min, en estufa. Luego se le agregó 2,5 mL de ácido tricloroacético, al 10% W/V en agua destilada y se centrifugó a 2 000 rpm por 10 min en centrifuga (Tehtnica ŽELESNI). De esta solución se tomaron 5 mL del sobrenadante y se mezclaron con 5 mL de agua destilada. Después, se agregó 1 mL de cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) al 1% y se dejó reposar por 10 min, para finalmente medir la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro de UV/Vis (T60 UV-Visible Spectrophotometer). Se utilizó ácido ascórbico como solución estándar de referencia (0,25 - 1 mg/mL).

Además, se refirió la  $EC_{50}$  del poder reductor como la concentración del extracto a la que se alcanza el 50% de la absorbancia máxima.

### 2.5.3- Evaluación del efecto del extracto acuoso en la inhibición de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón

El método de peroxidación lipídica o lipoperoxidación (POL) se refiere a la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se fundamenta en la cuantificación de los niveles de malondialdehído (MDA) uno de los productos finales de

la peroxidación lipídica (Ohkawa y col., 1979). El MDA se emplea como un biomarcador de daño o lesión molecular causado por los radicales libres a los lípidos celulares. La reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del MDA forma el cromóforo rosado que se nombra TBARS, con un máximo de absorción a una longitud de onda de 532 nm.

En nuestra investigación para realizar la evaluación del efecto del extracto en el modelo *in vitro* de peroxidación lipídica se emplearon homogenatos de hígado y cerebro de ratón. Se realizaron por triplicado los experimentos.

### **2.5.3.1- Preparación de homogenatos de hígado y cerebro de ratón**

Se emplearon ratones machos, de tres meses de edad, libres de patógenos, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Experimentales/Centro de Inmunología (LABEX®/CIM, Santiago de Cuba). Se tuvieron en cuenta las consideraciones éticas para el trabajo con animales, además de los procedimientos descritos por Puntel y col., 2007. En el cuidado de los animales se emplearon condiciones sanitarias convencionales, local climatizado y se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial para ratones (Ratonina, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB, La Habana) y agua *ad-libitum*. Se sacrificaron los ratones por cámara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), se obtuvo el cerebro entero y se extrajo el tejido hepático, se colocaron rápidamente en hielo (4 °C) y se pesaron.

Inmediatamente se homogenizaron en un dispersador de laboratorio (IKA®-T25 digital ULTRA-TURRAX®), suspendido en un medio tampón Tris-HCl, 10 mM a pH 7,5 (1:10 v/v). Los homogenatos se centrifugaron en centrífuga (HealForce, modelo Neofuge 15) por 10 min a 4 000 rpm. El procedimiento se realizó a 4 °C, para reducir el riesgo de degradación enzimática tisular. El sobrenadante obtenido se empleó en el ensayo de peroxidación lipídica.

### **2.5.3.2- Cuantificación de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón**

La cuantificación de la peroxidación lipídica, se realizó al considerar la producción de TBARS, de acuerdo al método de Puntel y col., 2007. Se prepararon alícuotas de 100 µL de los homogenatos de hígado y cerebro con 50µL de sulfato de hierro (II) (FeSO<sub>4</sub>) (10 µM), sustancia que induce la peroxidación lipídica, y 100 µL del extracto acuoso de *P. ostreatus* a las concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10 y 20 mg/mL. Se incubaron por una hora a 37 °C en un baño de agua termostataado (JULABO GmbH, Alemania).

La reacción del color se desarrolló al adicionar 200 µL de duodecil sulfato de sodio (SDS) (8%), 500 µL de buffer ácido acético (0,1mol/L, pH 3,4) y 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,6%). Las mezclas de la reacción se incubaron a 100 °C por una hora. La lectura se realizó en un Lector de Microplacas (FLUOstar OPTIMA, Alemania) a una absorbancia igual a 532 nm y se comparó con la curva del patrón de referencia MDA ( $y = 6,4267x - 0,194$ ,  $R^2 = 0,9679$ ), realizada según método descrito por Espín y col., 2017.

Se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica según ecuación 2.3:

$$\% \text{ Inhibición de la peroxidación lipídica} = \frac{AC - A}{A} \times 100 \% \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde:

AC =Absorbancia del control

A= Absorbancia de la muestra

## **2.6- Relación de la composición fenólica con la actividad antioxidante del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus***

Los resultados obtenidos del contenido fenólico expresados como mg de equivalente de ácido gálico / 100g del extracto en estudio, fueron correlacionados con los valores de los ensayos antioxidantes *in vitro* (actividad secuestradora del radical DPPH•, estimación del poder reductor y peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro), evaluadas en el estudio.

## **2.7- Evaluación *in silico* de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* con la proteína CYP2E1**

### **2.7.1- Recursos computacionales**

Los cálculos fueron realizados utilizando los recursos computacionales del Cluster del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente. Se utilizó el sistema operativo Linux distribución Debian.

La optimización de las geometrías moleculares de los fenoles se realizó utilizando el programa Chem3D versión 15.0, 2015. Como visualizadores gráficos de los modelos y las estructuras espaciales se utilizaron los programas ChemDraw versión 15.0, 2015 y el paquete de programas UCSF Chimera versión 1.9, 2010. Para la realización de los estudios de acoplamiento molecular se utilizaron los programas AutoDock 4.2 y AutoDockTools 1.5.6, 1999. Para la visualización de las interacciones hidrofóbicas y por puente de hidrógeno de los complejos se utilizó el programa Ligplot, 1996.

### **2.7.2- Representación y optimización de la geometría de los fenoles**

Para el trabajo con las estructuras de los fenoles, se utilizó el paquete de programa ChemOffice, 2015. El ChemDraw Professional 15.0, 2015 para la representación de las estructuras (Tabla 1) y el Chem3D 15.0, 2015 para la optimización de sus geometrías, utilizando para ello el método de mecánica molecular MMFF94 (en inglés Merck Molecular Force Field). Este método se emplea para obtener geometrías de partida lo más cercanas posible al mínimo de energía. Una vez optimizadas las estructuras, fueron guardadas como fichero.pdb, y posteriormente con el programa AutoDockTools 1.5.6, 1999, como fichero.pdbqt.

### 2.7.3- Preparación de la proteína CYP2E1

Para la preparación de la proteína se obtuvo su estructura tridimensional en la Base de Datos de Proteínas (en inglés Protein Data Bank) en formato .pdb, el cual es de acceso gratuito a través de la página web <http://www.pdb.org>. (Figura 3), (Berman y col., 2000). Haciendo uso del programa UCSF Chimera versión 1.9, 2010 se identificaron todos los residuos que no pertenecían a la proteína. Luego con el programa AutoDockTools 1.5.6, 1999 se agregaron los átomos de hidrógeno polares, las cargas Kollman y se asignaron átomos de tipo AD4 (AutoDock4). Una vez realizados estos pasos la macromolécula se guardó en formato pdbqt.

### 2.7.4- Identificación del sitio de unión

En el acoplamiento es necesario escoger una región de la macromolécula para su interacción con los ligandos. La región seleccionada es el sitio activo de la enzima o receptor, la cual se conoce, mediante el análisis de las estructuras de cada proteína y de su referencia. Se debe tener en cuenta que, sin el reconocimiento del sitio activo, el cálculo se vuelve más complicado y su requerimiento en tiempo aumenta considerablemente, además de existir la posibilidad de obtener resultados alejados de la realidad.

Según el análisis realizado en la literatura, los residuos de aminoácidos que se reportan como activos en la proteína de estudio son: **Ala<sup>299</sup>**, **Thr<sup>303</sup>**, **Phe<sup>106</sup>**, **Ile<sup>115</sup>**, **Phe<sup>116</sup>**, **Val<sup>364</sup>**, **Leu<sup>368</sup>**, **Phe<sup>478</sup>**, **Phe<sup>207</sup>** y **Phe<sup>298</sup>** (Porubsky y col., 2008).

### 2.7.5- Preparación del centro Grid y acoplamiento molecular

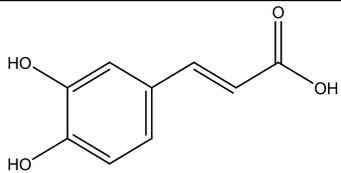
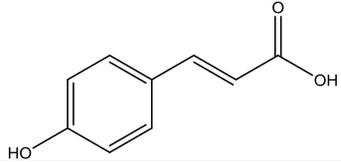
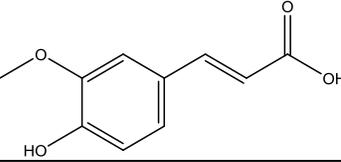
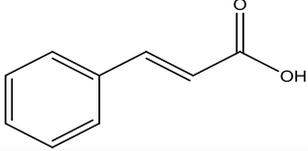
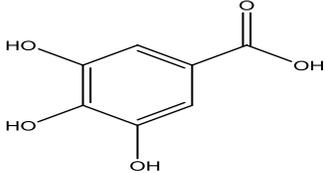
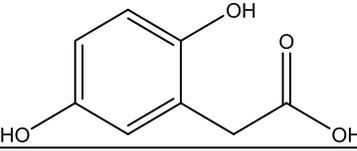
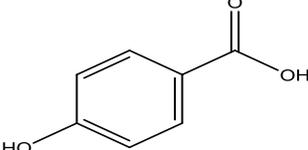
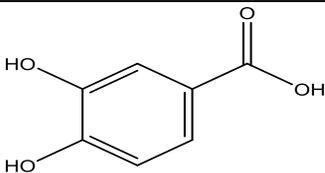
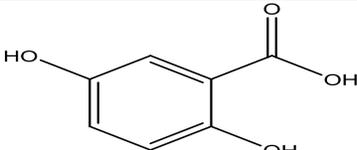
El programa AutoDock requiere de la realización de un pre-cálculo de los mapas grid para cada tipo de elemento presente en la macromolécula, ubicando el ligando alrededor de la región de interés (sitio activo) en la macromolécula. En la Tabla 2 se muestran las coordenadas y tamaño de la caja grid del sitio activo para la proteína tomada como blanco.

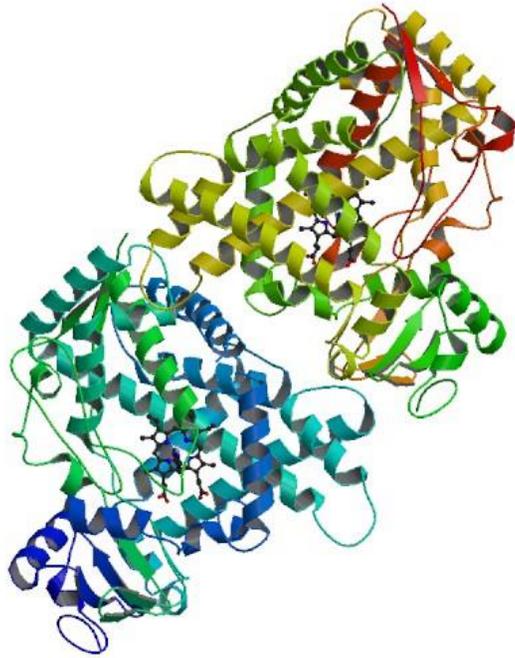
### 2.7.6- Acoplamiento molecular de los fenoles con la proteína

La metodología de acoplamiento molecular, consta de una serie de etapas; la primera es disponer de la estructura tridimensional de la molécula diana; la segunda consiste en tener una serie de ligandos potenciales con estructura tridimensional conocida; y la tercera etapa en la utilización de un algoritmo computacional, que selecciona cada uno de los ligandos y los hace interaccionar con la molécula diana en el sitio de unión previamente escogido por el usuario.

Para realizar la tercera etapa se parte de los ficheros grid.gpf y dock.dpf de los ligandos y la proteína descritos en los epígrafes anteriores, haciendo uso del programa AutoDockTools versión 1.5.6, 1999. En el caso del fichero grid.gpf primero se carga el ligando y luego la proteína. Posteriormente se añade la ubicación de la caja grid, según

**Tabla 1.** Estructura química de los fenoles en estudio.

<b>Ligando</b>	<b>Nombre</b>	<b>Estructura 2D</b>
<b>L1</b>	Ácido cafeíco	
<b>L2</b>	Ácido <i>p</i> -cumárico	
<b>L3</b>	Ácido ferúlico	
<b>L6</b>	Ácido cinámico	
<b>L7</b>	Ácido gálico	
<b>L8</b>	Ácido homogentísico	
<b>L9</b>	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	
<b>L10</b>	Ácido protocatecúico	
<b>L12</b>	Ácido gentísico	



Proteína CYP2E1  
PDBID: 3e6i  
Resolución: 2.2 Å

**Figura 3.** Estructura 3D de la proteína objeto de estudio CYP2E1.

las coordenadas y dimensiones descritas con anterioridad (Tabla 2), guardándose con la extensión que se desea.

En la preparación del fichero dock.dpf, se selecciona la proteína y luego el ligando que se desea acoplar a esta. Para los parámetros de búsqueda, se eligió el Algoritmo Genético Lamarckiano, en el cual se estableció un número de 50 corridas para cada uno de los acoplamientos.

## **2.8- Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron expresados como la Media  $\pm$  SD para tres réplicas de las muestras (n=3). Para las evaluaciones de la actividad antioxidante de los extractos a través de los ensayos de captación del radical de DPPH y estimación del poder reductor, se utilizó el test T de Student para un nivel de significación de  $p < 0,05$ . Además, se determinó la correlación entre la actividad antioxidante en los ensayos de DPPH•, poder reductor e inhibición de la peroxidación lipídica con la concentración de fenoles totales en el extracto. Se utilizó en el procesamiento de los datos el software profesional STATGRAPHICS Centurion XV (Statgraphics Technologies, Inc, E.U.A).

**Tabla 2. Coordenadas y tamaño de la caja *grid* para la proteína tomada como blanco.**

<b>Proteína</b>	<b>Coordenadas</b>			<b>Espaciado</b>	<b>Tamaño (puntos)</b>
	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>Z</b>		
3e6i (Hem 500)	5.452	3.331	11.036	0.375	30x30x30

### Capítulo 3. Resultados y discusión

El estrés oxidativo causado por la acción de las especies reactivas de oxígeno, 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, la diabetes, procesos inflamatorios, daños hepáticos, entre otros (Mitra y col., 2016). Esto ha provocado un aumento del interés por investigar posibles factores preventivos de estos procesos.

La actividad antioxidante de los hongos comestibles medicinales se ha asociado con la presencia de compuestos bioactivos como la ergotionina, el ácido gálico y ascórbico, los tocoferoles y el selenio así como con el contenido de polisacáridos y polifenoles presentes en los extractos (Kozarski y col., 2015).

Los hongos comestibles medicinales del género *Pleurotus*, en general, son ricos en antioxidantes naturales, que permiten sean empleados como suplementos nutricionales para la prevención de enfermedades. Extractos acuosos de cuerpos fructíferos y micelio de *P. ostreatus* juegan un papel importante en el mantenimiento del balance adecuado entre oxidantes y antioxidantes (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014).

#### **3.1- Componentes micoquímicos del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus***

En el presente estudio, resultó de interés evidenciar la presencia de compuestos fenólicos, dentro de estos fenoles totales, taninos y flavonoides, para ello se realizó un **tamizaje micoquímico** cualitativo al extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (Tabla 3).

Como se observa en la tabla 3, en el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* se obtuvieron resultados positivos para fenoles, taninos y flavonoides con los métodos de cloruro férrico, ácido sulfúrico, Shinona, álcalis y Rosemheim.

La coloración rojo vino obtenida en el ensayo del cloruro férrico para el extracto, sugiere la presencia de polifenos, dentro de estos taninos, al tratarse de un extracto acuoso. Este resultado coincide con los obtenidos en el estudio fitoquímico desarrollado por Morris y col., 2014 en extractos crudos de *Pleurotus ostreatus* (cuerpos fructíferos, micelio y biomasa seca).

Los ensayos de ácido sulfúrico concentrado, Shinona y Rosemheim resultaron positivos, sugiriendo la presencia de flavonoides. En el ensayo de ácido sulfúrico concentrado la coloración anaranjada obtenida sugiere la presencia de flavonoides del tipo flavanonas, la coloración carmelita–anaranjada clara obtenida en el ensayo Shinoda sugiere la presencia de flavonas, con el ensayo con álcalis se obtuvo una coloración amarilla a anaranjada sin opalescencia que sugiere flavonas, flavanonas e isoflavonas y con Rosemheim el color anaranjado sugiere antocianidinas, según Ochoa y col., 2000.

**Tabla 3.** Tamizaje micoquímico del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.

Metabolito	Ensayo	Resultados	Observaciones
Fenoles y Taninos	Cloruro Férrico	+++	Color rojo vino
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado	+++	Color anaranjado
	Shinona	+++	Color carmelita a anaranjado
	Álcalis	++	Color amarillo a anaranjado Sin opalescencia
	Rosemheim	++	Color anaranjado

*Leyenda: (+++) indica evidencia positiva clara; (++) indica evidencia positiva, (+) indica evidencia positiva con posibilidades de interferencias o no definida; (-) indica resultado negativo.*

Estos resultados coinciden con reportes realizados por diversos investigadores en extractos de *P. ostreatus*, tales como Morris y col., 2014, los cuales, sugirieron la presencia de fenoles y flavonoides, igualmente Edet y col., 2016 reportaron una presencia positiva clara de fenoles y moderada de flavonoides en extractos acuosos de *P. ostreatus*. Los investigadores Menaga y col., 2013, revelaron la presencia positiva de fenoles y moderada de flavonoides en extractos metanólicos de *P. florida*, en cambio Modi y col., 2014 revelaron la presencia de flavonoides en extractos acuosos de *P. ostreatus* solo en el ensayo con álcalis.

Al respecto, Álvarez (2009), refiere la presencia de polifenoles en extractos hidrosolubles crudos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* CCEBI-3024.

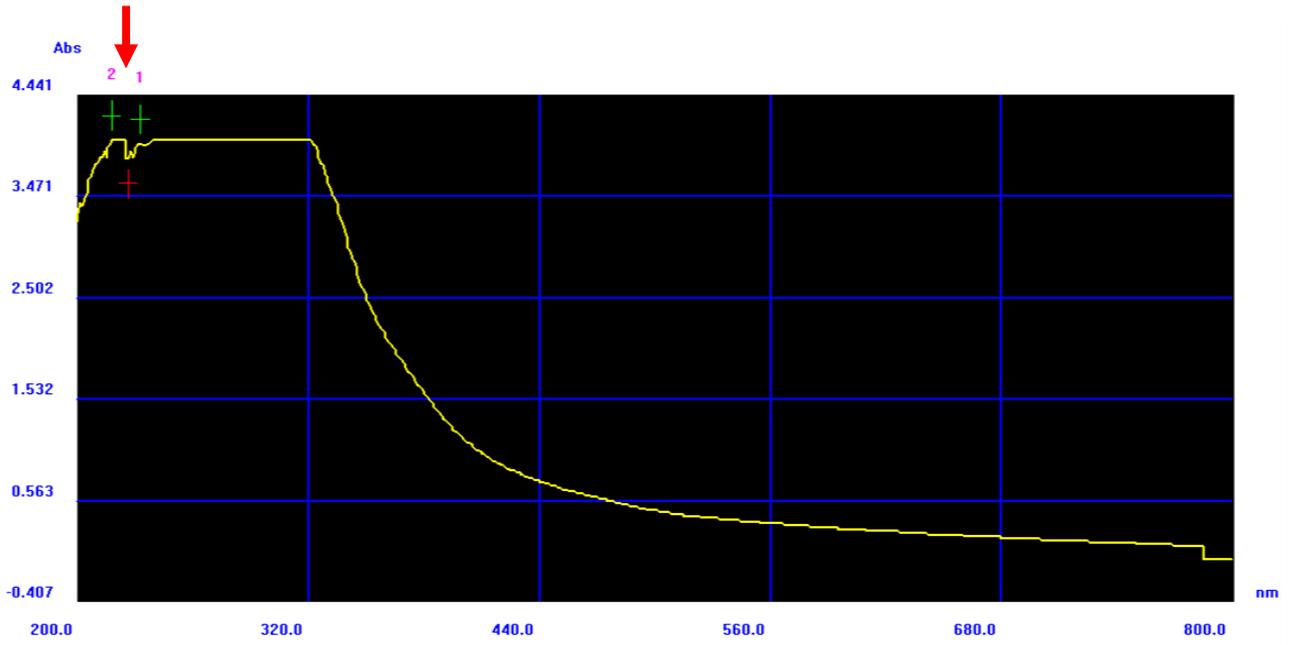
Estos resultados, ofrecen una visión cualitativa de la composición micoquímica presente en el extracto de *P. ostreatus* y no pueden considerarse como un resultado concluyente, ya que la presencia o la ausencia de un metabolito está influenciada por varios factores como, por ejemplo: la composición del sustrato, las condiciones del cultivo, almacenamiento y procesamiento de los hongos, entre otras. (Rathatore y col., 2017).

Así mismo, el tamizaje fitoquímico permite la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo, la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal. Constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados de otros ensayos cuantitativos (Osorio, 2009). Además, según los investigadores Ochoa y col., 2000 estos ensayos no brindan un criterio absoluto y confirmativo de la presencia de estos compuestos, pues se pueden producir interferencias en estas reacciones. Sin embargo, concluyen que esta técnica sí da un criterio de la composición química que pueda existir en un extracto de una droga vegetal.

Los compuestos fitoquímicos cuya presencia fue identificada en el extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* podrían contribuir a las numerosas propiedades medicinales que se le atribuyen.

### **3.2- Análisis del espectro de absorción (200 – 800 nm) UV-visible del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus***

Se realizó el espectro de absorción (200 – 800 nm) UV-visible del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* para la caracterización de los compuestos fenólicos y flavonoides (Figura 4). Los compuestos fenólicos se encuentran en la banda del rango de 230 a 280 nm, resultados similares a los obtenidos por Ozen y col., 2016 en las especies de *Lactarius controversus* y *Lactarius musteus*. Demostrando que los resultados obtenidos en el tamizaje micoquímico se justifican con la banda obtenida en el espectro de absorción. Siendo necesario cuantificar el contenido fenólico presente en el extracto y analizar su correlación directa con la actividad antioxidante de *P. ostreatus*.



**Figura 4.** Espectro UV-visible (200 – 800 nm) del extracto acuoso a altas temperaturas de *P. ostreatus*.

### 3.3- Identificación de compuestos fenólicos por HPLC

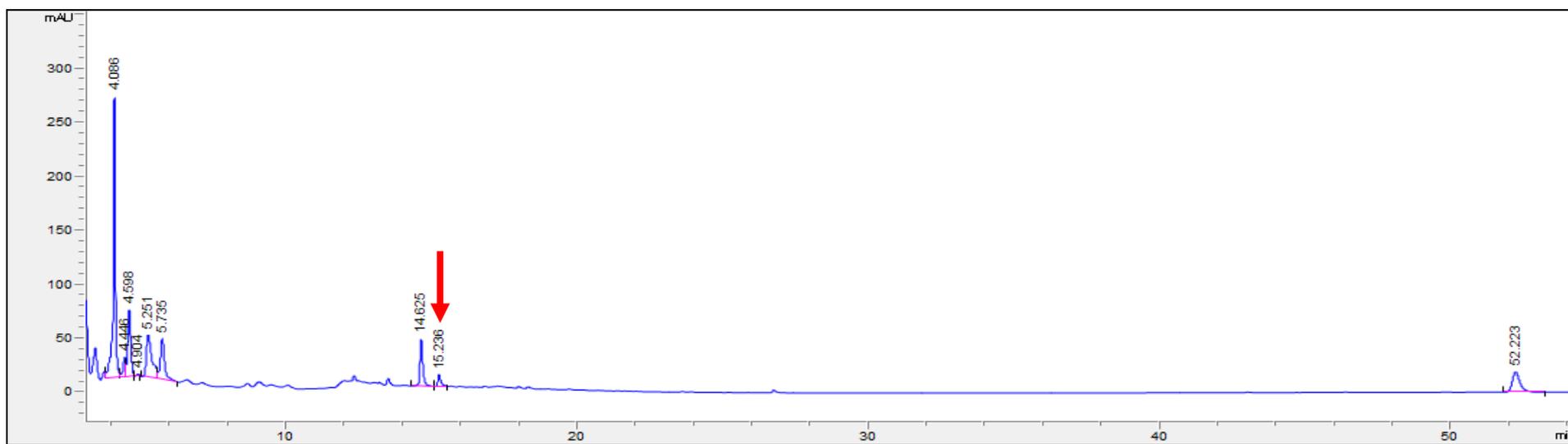
El perfil fenólico se lleva a cabo para identificar y cuantificar compuestos fenólicos activos en los extractos de hongos comestibles-medicinales. Los compuestos fenólicos muestran una gran diversidad de estructuras químicas producto a la presencia de estructuras isoméricas, que conducen a dificultades en la separación, así como, la falta de patrones estándar, todo ello conduce a que algunos compuestos puedan escapar de las metodologías habituales de análisis. Por lo tanto, se emplea comúnmente el estudio por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplado a distintos dispositivos de detección (El-Enshasy y col., 2018).

En la figura 5 se muestra el perfil de HPLC del extracto acuoso de *P. ostreatus* obtenido en la presente investigación. Donde se observan nueve picos eludidos entre (2 - 58 min) a 280 nm, sin embargo, solo un pico con tiempo de retención 15.23 min, mostrado en la figura 5 por una flecha roja, podría ser un compuesto fenólico en hongos comestibles, tal es el caso del ácido homogentísico. Así mismo, Llauradó y col., 2020, reportaron en un extracto acuoso de *P. ostreatus* obtenido a bajas temperaturas, el ácido homogentísico con un tiempo de retención de 15.21 minutos.

El resultado del perfil de HPLC obtenido en la investigación fue contrastado con otros reportes, confirmándose la presencia de compuestos fenólicos en el extracto acuoso a altas temperaturas de *P. ostreatus*. La corrida del extracto acuoso observada en el cromatograma fue similar a otros estudios de HPLC reportados por Alam y col., 2010 e Im y col., 2014. Los picos identificados fueron análogos a los compuestos de referencia estándar y compuestos fenólicos de *Pleurotus florida* (Im y col., 2014), utilizando condiciones cromatográficas similares. Específicamente los investigadores Im y col., 2014 reportaron el ácido homogentísico en el extracto acuoso a altas temperaturas de *P. florida*, con tiempos de retención similares a los de nuestro experimento.

Los investigadores Palacios y col., 2011 exploraron las propiedades antioxidantes de ocho hongos comestibles (*Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*), donde detectaron y cuantificaron a 280 nm por HPLC el contenido fenólico presente. En particular en la especie *P. ostreatus*, reportaron la presencia de los ácidos *p* cumárico, felúrico, gálico, gentísico, *p*- hidroxibenzoico, homogentísico, protocatecúico y mirecitina, y además refirieron que todos los fenoles detectados son ácidos fenólicos. El ácido homogentísico fue uno de los fenoles de mayor concentración detectados en todas las especies evaluadas, específicamente en la especie *P. ostreatus*, refirieron una concentración de  $629,86 \pm 1,54 \mu\text{g/g}$ .

Por su parte, Oke y Aslim., 2011 obtuvieron en extractos acuosos de *P. eryngii*, seis compuestos fenólicos, mediante HPLC, ellos fueron los ácidos *p*-hidroxibenzoico, gálico, cinámico, cafeico, siríngico y la vanillina. Estos autores plantean que los compuestos fenólicos detectados y cuantificados, inhiben la peroxidación lipídica inducida por los grupos hierro/azufre de la cisteína y la hemólisis inducida por el peróxido de hidrógeno, además obtuvieron que la mayor concentración de fenoles fue en el ácido *p*-hidroxibenzoico.



**Figura 5.** Cromatograma del extracto acuoso a altas temperaturas de *P. ostreatus* por HPLC.

Estudios realizados por Im y col., 2014, en extractos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus florida*, detectaron siete compuestos fenólicos en extractos acuosos a altas temperaturas, ellos fueron los ácidos gálico, homogentísico, protocatecúico, cafeíco y el resveratrol, naringenina y hesperetina.

El perfil de HPLC del extracto acuoso de *P. ostreatus* puede ser considerado como una huella digital en el análisis del espectro, para el control de la calidad de las preparaciones de la seta. Además, la importancia de esta herramienta radica en que constituye una plataforma para identificar y corroborar la principal o parcial composición química de las preparaciones herbales (ejemplo, bioproductos de setas comestibles) (Chen y col., 2012; Xu y col., 2017), los cuales pueden ser principalmente utilizados como material crudo para formulaciones funcionales o nutricionales (ej, suplementos dietéticos).

Los puntos claves para garantizar el control de la calidad de los suplementos dietéticos derivados de hongos comestibles-medicinales necesitan de la estandarización de los protocolos para la identificación de las sustancias bioactivas, así como para su producción. También es imprescindible el análisis de su seguridad, regulación, eficacia y la elucidación de sus mecanismos de acción (Wasser, 2014).

En investigaciones de Yildiz y col., 2015 se realizaron estudios referidos al perfil individual de compuestos fenólicos en cuatro especies de hongos comestibles medicinales, *Ganoderma lucidum*, *Morchella esculenta*, *Lentinula edodes* y *Hericium erinaceus*, demostrando que, la caracterización individual de los compuestos fenólicos de los hongos, resulta de gran importancia, ya que estos pueden hacer una contribución significativa a las fuentes naturales antioxidantes.

En general se plantea que los principales compuestos fenólicos encontrados en hongos comestibles son los ácidos fenólicos (Ferreira y col., 2009). Las diversas especies de hongos contienen diferentes compuestos fenólicos pudiendo ser de tres a quince, específicamente el ácido gálico es el más común de ellos (Ferreira y col., 2009; Im y col., 2014).

Las diferencias en el contenido fenólico observada en las diferentes investigaciones pueden ser el resultado de los diferentes métodos de cultivo, de preparación, la extracción, así como la variabilidad geográfica de cada hongo comestible (Alam y col. 2010; Palacios y col., 2011; Muszyńska y col. 2013; Woldegiorgis y col. 2014; Gasecka y col. 2015). En este sentido, algunos investigadores consideran que otros análisis son necesarios para determinar las características químicas de los compuestos bioactivos de hongos comestibles, incluso más que sus efectos en diferentes modelos *in vivo* y ensayos clínicos (Adebayo y col., 2018).

Otros autores, refieren para *Pleurotus ostreatus*, la presencia de ácido cafeíco (Woldegiorgis y col., 2014); ácido cinámico (Muszynska y col., 2013) y ácido vanílico (Gasecka y col., 2015).

Reportes de Puttaraju y col., 2006 informaron entre los principales compuestos fenólicos detectados en extractos acuosos de diferentes hongos comestibles de la India, al ácido gálico, tánico, protocatecúico y el gentísico y refieren la correlación existente entre la polaridad del disolvente de extracción y el contenido fenólico de los extractos resultantes.

Los investigadores Dundar y col., 2015 en extractos metanólicos de *P. ostreatus*, obtuvieron siete ácidos fenólicos mediante HPLC, los cuales fueron protocatecúico, catequina, cafeico, sirengico, vanílico, *o*-cumárico y quercetina.

El contenido de compuestos fenólicos puede ser utilizado como un importante indicador de la capacidad antioxidante. Numerosos reportes han mostrado la relación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico (Jayakumar y col., 2009). Los extractos de hongos comestibles tienen elevados niveles de compuestos fenólicos, los cuales exhiben actividades de captación de radicales libres como agentes donadores de electrones, además de propiedades de quelación de iones férricos (Jayakumar y col., 2011). La elevada actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es producto al número de grupos hidroxilos que presentan. En el caso específico de los flavonoides, la actividad antioxidante, resulta de la combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Kumar y Pandey, 2013; Gil-Ramírez y col., 2016).

### **3.4- Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y ácido ascórbico en el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus***

En este trabajo se refirió la presencia de los fenoles y flavonoides, compuestos que fueron determinados desde el punto de vista cuantitativo, por constituir uno de los metabolitos secundarios antioxidantes más potentes.

En la tabla 4 se refleja el valor de los compuestos fenólicos en el extracto, obteniéndose el contenido de **fenoles totales** de  $106 \pm 0,04$  mg/100g expresados en equivalente de ácido gálico, estos resultados resultan similares a los obtenidos por Morris y col., 2014 (138 mg/100g) en la especie *Pleurotus ostreatus* en similares condiciones y por Oke y Aslim, 2011 en la especie *Pleurotus eryngii* con  $142 \pm 0,01$ mg de ácido gálico/100g.

Por otro lado, González–Palma y col., 2016 evaluaron el contenido de fenoles totales en diversos estados de crecimiento de *P. ostreatus*, tanto en extractos acuosos como etanólicos. En el caso de los extractos acuosos a altas temperaturas de cuerpos fructíferos, la concentración de compuestos fenólicos fue de  $9,92 \pm 0,05$  mg ácido gálico/g (992 mg de ácido gálico/100g). Estos investigadores observaron que el contenido polifenólico de los extractos depende de la fase de crecimiento del hongo seleccionada y del solvente utilizado.

Es importante destacar que debido a la estructura química de los polifenoles, basada en anillos aromáticos sustituidos con un grupo hidroxilo, justifica que sean solubles en solventes polares como el agua y el etanol, entre otros, cuando se encuentran en

**Tabla 4.** Contenido de fenoles totales, flavonoides y ácido ascórbico en el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.

Compuestos fenólicos		Ácido ascórbico
Fenoles totales	Flavonoides	
(mg / 100g)	(mg / 100g)	(mg / 100g)
106 ± 0,04	2,8 ± 0,92	10.29 ± 1,6

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar

forma libre o conjugada. Sin embargo, el agua tiene dos átomos de hidrógeno que hacen más fuerte su polaridad, al compararse con el etanol, que tiene dos átomos de carbono que no ceden sus electrones tan fácilmente, por ser medianamente electronegativos, demostrando así que con el empleo del agua como solvente se incrementa el contenido de los compuestos fenólicos (Urquiza y Fenton Navarro, 2016).

En relación con los solventes empleados es de destacar que Vamanu, 2013 evaluó el contenido de fenoles en extractos de *P. ostreatus*, obteniendo resultados desde  $70,2 \pm 0,54$  mg de ácido gálico/g en extractos acuosos a altas temperaturas hasta  $57,2 \pm 0,52$  mg/g en extractos etanólicos. Este autor refiere además que el contenido de compuestos fenólicos varía dependiendo del solvente empleado.

También, los investigadores Palacios y col., 2011, evaluaron el contenido fenólico en varios extractos de hongos comestibles medicinales, entre los que se incluye la especie *Pleurotus ostreatus*. Los resultados arrojaron que el contenido fenólico en los hongos comestibles medicinales estudiados, se encuentra entre 1 – 6 mg de fenoles/g de materia seca (100 – 600 mg/100g), en particular en la especie *P. ostreatus* obtuvieron 154 mg/100g en equivalentes de ácido gálico.

Otros investigadores como Peraza y col., 2019 reportaron un contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus ostreatus* de 73 mg/100g, y además compararon este resultado con los obtenidos por varios autores en diversas especies de *Pleurotus*. En dicho estudio concluyeron que las diferencias en la concentración de fenoles pueden atribuirse a diferencias genéticas entre las especies y a las condiciones de cultivo. De manera similar, reporta Sakamoto, 2018 que la composición específica y característica de cada seta puede estar asociada con factores ambientales entre los que incluye la temperatura, la luminosidad, la humedad y las condiciones de cultivo como las concentraciones de los nutrientes, entre otros.

Investigadores como Heleno y col., 2015, plantean la existencia de una correlación positiva entre la intensidad del color de los extractos con la presencia de fenoles totales, asociado a su vez con un aumento de la actividad antioxidante.

Además, las diferencias en los resultados de los contenidos de polifenoles totales de las investigaciones realizadas por los diferentes autores, puede deberse según Ferreira y col., 2009 a la influencia de los compuestos no fenólicos como el ácido ascórbico, los azúcares y los aminoácidos que podrían producir una sobrevaloración del contenido de polifenólico. También, Palacios y col., 2011 refieren que la actividad antioxidante de los extractos se correlaciona comúnmente con el contenido fenólico total, evaluado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu; sin embargo, los compuestos fenólicos individuales pueden mostrar efectos antioxidantes marcadamente diferentes como resultado del sinergismo, antagonismo, coantioxidación y la presencia de retardadores de oxidación.

Entre los compuestos fenólicos, a los **flavonoides** se les brinda una especial atención debido al aporte que estos brindan en la actividad antioxidante de plantas y hongos (El-Enshasy y col., 2018), lo que ha sido demostrado en múltiples publicaciones.

En nuestro estudio, se obtuvieron valores de flavonoides de  $2,8 \pm 0,92$  mg/100g expresados como equivalentes de catequina (Tabla 4). Dichos resultados resultan similares a los reportados por De la Cruz, 2012 en la misma especie, en similares condiciones de experimentación, con valores de concentración de flavonoides de 3,6 mg/100g.

Por su parte, Gasecka y col., 2016 reportaron en extractos etanólicos de *P. ostreatus* y *P. eryngii* valores de flavonoides de  $2,11 \pm 0,19$  y  $1,26 \pm 0,17$  mg/g de extracto, respectivamente. Estos autores plantearon que el contenido de flavonoides en diversas especies de *Pleurotus* oscila entre 1,2 a 2,9  $\mu$ g/g de extracto, incluso puede llegar hasta 7,79 mg/g de extracto. Refirieron además que la diferencia obtenida entre las concentraciones de estos metabolitos en las diversas investigaciones puede deberse a la variada composición de los sustratos.

Otros autores como Dandapat y Sinha, 2015 reportaron contenidos de flavonoides de  $13,78 \pm 0,52$  mg/100g en extractos acuosos de *Pleurotus tuber-regium*. En cambio, Jaworska y col., 2015 refirieron un contenido total de flavonoides en *Pleurotus ostreatus* de 170 mg/100g de materia seca. En este sentido, Vamanu, 2013 refiere que, dependiendo del solvente empleado, el contenido de flavonoides en *P. ostreatus* se encuentra en un rango entre  $23,1 \pm 0,41$  hasta  $212,25 \pm 0,36$  mg de quercetina/g de extracto.

Algunos investigadores como Jayakumar y col., 2010, reportaron altas concentraciones de los flavonoides crisina (40 mg/100 g) y rutina (31,2 mg/100 g) en extractos etanólicos de *P. ostreatus*, asociándolo a las propiedades antioxidantes del extracto de dicho hongo comestible.

Existen limitadas evidencias disponibles con relación a la evaluación del contenido de flavonoides totales en las setas comestibles-medicinales, aspecto señalado por Palacios y col., 2011. Estos autores evaluaron el contenido de flavonoides en diversas especies de hongos comestibles medicinales, reportando que la concentración de flavonoides se encuentra entre 0,9 - 3 mg/g de materia seca (90-300 mg/100g) dependiendo de la especie en cuestión, y en particular en la especie *P. ostreatus* obtuvieron 1,24 mg/g equivalentes de catequina. Además concluyen que el contenido de flavonoides no se correlaciona necesariamente con el contenido de compuestos fenólicos.

Resultan controversiales las consideraciones de autores como González-Palma y col., 2016 que no reportaron flavonoides en estudios realizados en extractos de *Pleurotus ostreatus* en diferentes estados de crecimiento. Por su parte, Gil-Ramírez y col., 2016 analizaron el genoma de diversas especies de *Pleurotus* y plantearon que las mismas no presentan las secuencias que codifican las enzimas fundamentales en la síntesis de

los flavonoides. Estos criterios divergentes podrían estar relacionados con las limitadas evidencias disponibles señaladas por los investigadores Palacios y col., 2011.

Otro de los compuestos determinados en la presente investigación fue el **ácido ascórbico (vitamina C)**. Este se considera un importante agente antioxidante *in vivo*, en el hombre es considerada una vitamina esencial, incapaz de ser sintetizada debido a la falta de la enzima gulonolactona oxidasa. Incluye dos compuestos con elevada actividad antioxidante: el ácido L-ascórbico y el ácido L-deshidroascórbico (Sies y Stahl W, 1995; Carocho y col., 2014).

El ácido ascórbico presenta numerosos efectos beneficiosos dentro de ellos, actúa modificando las moléculas superóxido y a otras formas reactivas del oxígeno les cede un electrón para estabilizarlas, protegiendo de esta manera a los lípidos de las membranas celulares del daño oxidativo (El-Enshasy y col., 2018). El ácido ascórbico actúa como cofactor de numerosas enzimas por lo que se distingue en la disminución de las peroxidaciones lipídicas y lipoproteicas mejorando de esta forma la función vascular (Yavari y col., 2015).

Además, facilita la absorción del hierro, se incorpora a diversos productos farmacéuticos como ingrediente esencial, estabilizador del complejo de vitaminas B o como antioxidante (Sorice y col., 2014). Se ha demostrado que juega un papel importante en la estimulación del sistema inmune al atenuar las respuestas inflamatorias crónicas, ampliamente usado en el tratamiento de diversas enfermedades como el escorbuto, la anemia, trastornos hemorrágicos, entre otras; resulta esencial para el desarrollo y regeneración de músculos, huesos, dientes y la piel (Yavari y col., 2015).

En el presente estudio, los valores de ácido ascórbico (vitamina C) obtenidos se muestran en la tabla 4, cuyo resultado fue de  $10,29 \pm 1,6$  mg/100g expresados en equivalente de ácido L-ascórbico, resultados similares a los obtenidos por Vamanu, 2013 que reportó en extractos acuosos a altas temperaturas de *P. ostreatus* valores de ácido ascórbico de  $6,72 \pm 0,27$  mg/g de extracto.

Por su parte, Gasecka y col., 2016 reportaron en extractos etanólicos de *P. ostreatus* y *P. eryngii* valores de  $10,28 \pm 0,39$  y  $16,64 \pm 0,47$  mg/100g de peso seco, respectivamente, a su vez plantearon que la concentración de ácido ascórbico depende de la especie en cuestión y oscila entre 5 y hasta 50 mg/100 g de peso seco.

Estudios realizados por Khan y Tania, 2012, refirieron que en extractos de *Pleurotus ostreatus* el contenido de ácido ascórbico puede oscilar entre 28 - 35 mg/100g, empleando diversos solventes. Sin embargo, Jayakumar y col., 2009 obtuvieron un elevado contenido de ácido ascórbico (25 mg/100 g) en extractos de *P. ostreatus*, comparado con otras especies de hongos comestibles como *Agaricus bisporus*, cuyo contenido oscila entre 17- 21 mg/100g.

Otros estudios, reportan valores de vitamina C entre  $3,27 \pm 0,47$  hasta  $3,65 \pm 0,17$  mg/100g de materia seca, en cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, cultivado en diversos

sustratos (Jonathan y col., 2012). En este sentido, Gasecka y col., 2016 refieren que la incorporación de elementos traza en el sustrato incrementa el contenido de ácido ascórbico en los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*.

Estudios han indicado que el ácido ascórbico de los hongos comestibles (*Ganoderma lucidum* y *P. ostreatus*) reduce los radicales ascorbato, que juegan un papel vital como antioxidante (Islam y col., 2019), a su vez Jayakumar y col., 2011 refieren que el ácido ascórbico interactúa directamente con los radicales  $O_2^{\bullet-}$  y  $OH^{\bullet}$  en el plasma sanguíneo, evitando así el daño en la membrana de los glóbulos rojos, ayuda además al  $\alpha$ -tocoferol en la inhibición de la peroxidación lipídica (POL) al reciclar el radical tocoferol.

### **3.5- Evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus***

Existen diversos métodos para estimar la capacidad antioxidante de los hongos comestibles medicinales. Estos tienen en cuenta los variados mecanismos de defensa antioxidante, destacándose entre los más importantes la capacidad para secuestrar y reducir radicales libres, acomplejar metales de transición e inhibir la peroxidación lipídica (Heleno y col., 2010).

Estos métodos pueden ser tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro* existe un amplio número de ellos, capaz de evaluar la capacidad antioxidante, dentro de estos se encuentran aquellos que calculan la actividad secuestrante del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH $\bullet$ ), el poder reductor, o la inhibición de la peroxidación lipídica, entre otros; aunque todavía no existe un consenso sobre la combinación más adecuada de estos (Sharma y col., 2012).

Igualmente, aunque existen marcadores del daño oxidativo a biomoléculas los resultados *in vivo* siguen siendo contradictorios (Heleno y col., 2010). Por su parte, Shahidi y Zhong (2015) indican que actualmente se han desarrollado una serie de análisis químicos y modelos biológicos que ayudan a medir, a escala molecular o celular, la capacidad secuestradora de los radicales, el poder reductor y otras propiedades específicas de los antioxidantes. Estos mecanismos incluyen la transferencia de átomos de hidrógeno, la transferencia de electrones, entre otros.

Dentro de los métodos más utilizados *in vitro* se encuentra el de captación del radical DPPH $\bullet$ , la estimación del poder reductor y el de inhibición de la peroxidación lipídica (Aksoy y col., 2013).

#### **3.5.1- Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH $\bullet$ )**

El radical DPPH $\bullet$  es un radical estable, por tal motivo ha sido empleado ampliamente en la determinación de las características antioxidantes de una sustancia o extracto. Si la sustancia evaluada posee actividad antioxidante directa, entonces la misma será capaz de reducir al 2,2 difenil -1-picrilhidracilo por acción directa sobre él, ya sea por transferencia de un electrón o de un radical hidrógeno y como consecuencia de ello se

produce una disminución del color del radical DPPH• producto de la acción del antioxidante (Mruthunjaya y Hukkeri, 2008).

Para analizar la capacidad de reducción de radicales DPPH• por el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, se empleó el ácido ascórbico como control positivo, sustancia antioxidante de referencia en concentraciones de 0,25 – 1 mg/mL.

En la figura 6 se muestran los porcentos de inhibición del radical DPPH• para el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* y para el ácido ascórbico como patrón estándar. El valor más alto en cuanto al porcentaje de inhibición del radical DPPH• para el ácido ascórbico y para el extracto acuoso de *P. ostreatus* fue a 1mg/mL con porcentos de 95,64 y 93,25 respectivamente. El ácido ascórbico como antioxidante de referencia mostró mayor capacidad de secuestro del radical DPPH• comparado con el extracto en estudio.

Los resultados obtenidos para el extracto y el control positivo indican que existe una relación actividad-concentración dependiente, donde a medida que aumenta la concentración va aumentando el poder de captación del radical DPPH• por los compuestos presentes. Resultado que coincide con los reportes de Abdullah y col., 2012.

Además, como se observa en la figura 6, la muestra presentó actividad secuestradora del radical DPPH•, por lo que contiene constituyentes activos capaces de transferir un átomo de hidrógeno o un electrón al radical y con ello manifestar propiedades antioxidantes.

Al observar los resultados obtenidos, el extracto acuoso manifiesta una actividad antioxidante inferior a la del ácido ascórbico empleado como patrón de referencia, lo que se considera adecuado si se tiene en cuenta que la concentración de los metabolitos responsables de la acción antioxidante en el extracto siempre sería muy inferior a la concentración referida de los compuestos puros, pero demuestra las potencialidades antioxidantes de dicho extracto.

Resultados similares obtuvieron Milovanović y col., 2014 en extractos etanólicos de cuerpos fructíferos de *P. citrinopileatus* que mostraron una alta captación del radical DPPH• de 94,9% a la concentración de 5 mg/mL, también refieren que *Pleurotus* contiene numerosos compuestos bioactivos que le confieren las propiedades de antioxidantes naturales que presenta.

Investigadores como Jayakumar y col., 2009 evaluaron la eficacia en la captación de radicales libres en extractos etanólicos de *P. ostreatus* comparado con el ácido ascórbico como solución estándar, y obtuvieron a la concentración máxima de 10 mg/mL, un porcentaje de inhibición de 56,2 y 60,17, respectivamente.

Del mismo modo, Alispahić y col., 2015 en un estudio sobre la actividad antioxidante de extractos de hongos comestibles frescos reportaron un 43.88% de inhibición del radical

DPPH• en un extracto metanólico de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*. Otros investigadores como Sudha y col., 2012 reportaron para *P. eous* porcentos de inhibición entre 12,42 y 70,21 del radical DPPH•, a una concentración de 2 - 10 mg/mL. También, Sharma y col., 2009 reportaron a la concentración de 10 mg/mL un 56% de captación del radical DPPH• en la especie *P. ostreatus*. Por su parte, Dundar y col., 2015 reportaron porcentos de inhibición de este radical en extractos metanólicos de *P. ostreatus* de 95,43 a 20 mg/mL.

Los investigadores Elbatrawy y col., 2015 examinaron las propiedades antioxidantes de extractos de siete especies de hongos obtenidos con solventes diferentes, entre los que se incluyen extractos acuosos a altas temperaturas de *P. ostreatus* donde obtuvieron 57,87% de inhibición del radical DPPH• y concluyen que en los ensayos DPPH• el extracto más potente fue el extraído empleando el agua como solvente, así como, que las diversas especies de hongos contienen variados compuestos antioxidantes en diferentes concentraciones con numerosos niveles de hidroafinidad. Además, plantean que las propiedades medicinales de *P. ostreatus* pueden estar relacionadas con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, las vitaminas C y E, y los polisacáridos.

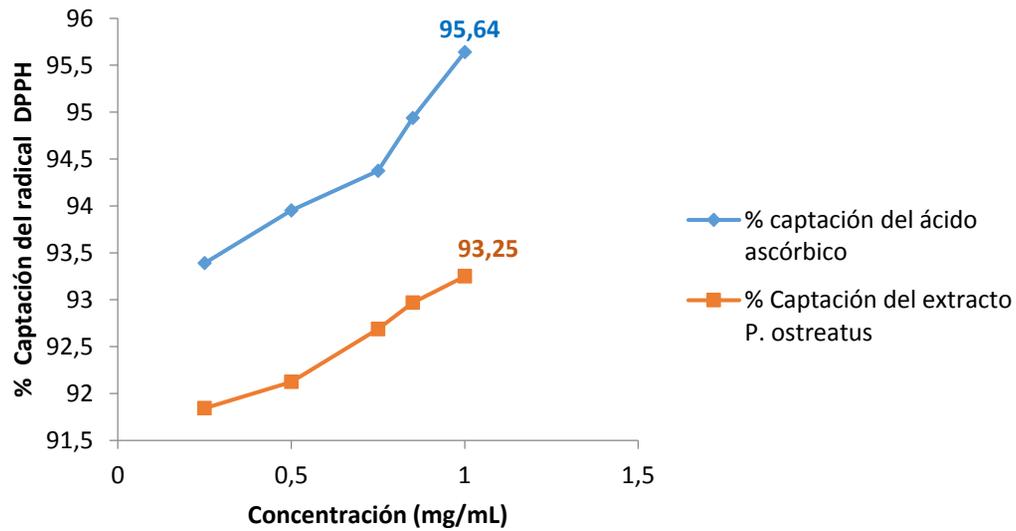
Así mismo, reportes de Sánchez, 2017b refieren que existen diferencias importantes en la capacidad antioxidante y el contenido fenólico de diversas cepas de especies de *Pleurotus* y analiza que la capacidad antioxidante por medio de la reacción de DPPH• varía según la especie en estudio.

En la figura 7, se muestran los valores de EC<sub>50</sub>, estimados en función de la concentración del ácido ascórbico y del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* a la cual se alcanza el 50% de captación máxima del radical DPPH•. Obteniéndose un valor de 14,95 ± 0,006 mg/mL para el ácido ascórbico y de 21,22 ± 0,004 mg/mL en el extracto de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.

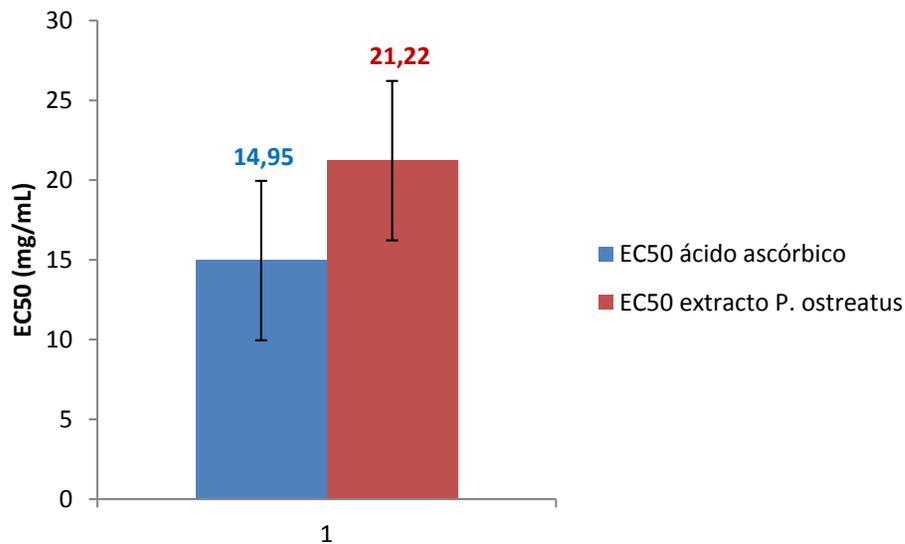
En la figura 7 se observa que el ácido ascórbico presentó un EC<sub>50</sub> menor que el del extracto en estudio. Resultados adecuados si se refieren las conclusiones de los investigadores, Abdullah y col., 2012 que plantean que el menor valor de EC<sub>50</sub> indica una mayor capacidad del extracto para actuar como eliminadores de radicales DPPH•, además refieren que los compuestos empleados como controles positivos son excelentes eliminadores de radicales DPPH• comparada con los extractos de hongos comestibles estudiados.

Los resultados del EC<sub>50</sub> obtenidos en nuestro estudio para el extracto acuoso y para el ácido ascórbico, no mostraron diferencias significativas para una  $p < 0,05$ , por tal motivo el extracto posee propiedades antirradicalicas.

En el estudio realizado por Chirinang y Intarapichet, 2009 refirieron valores de EC<sub>50</sub> en el ensayo de eliminación de radicales DPPH• para extractos acuosos a altas temperaturas de *Pleurotus ostreatus* de 11,56 mg/mL, mejores que los obtenidos para la especie *P. sajor-caju* (EC<sub>50</sub> = 13,38 mg/mL). Estos investigadores concluyen que



**Figura 6.** Porcentos de captación del radical DPPH• para el ácido ascórbico y para el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.



**Figura 7.** Valores de EC<sub>50</sub> en el ensayo de captación del radical DPPH• del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* y para el ácido ascórbico. No existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

probablemente esto es debido al mayor contenido de compuestos fenólicos y fibra dietética presente en la especie *Pleurotus ostreatus*.

Investigadores como Kongkla y Poeaim, 2016, evaluaron la actividad antioxidante de extractos metanólicos de cinco especies de *Pleurotus*, obteniendo para el extracto de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* un valor de EC<sub>50</sub> de 5,00 mg/mL.

Por su parte, Oke y Aslim, 2011 reportaron en *P. eryngii* valores de EC<sub>50</sub> para extractos acuosos de 0,545 ± 0,007 mg/mL y 0,909 ± 0,011 mg/mL para extractos etanólicos. Estos autores refieren que los extractos acuosos muestran una capacidad de captación del radical DPPH• más efectiva que los extractos metanólicos, por lo que diferentes extractos pertenecientes a la misma especie pueden mostrar diferentes actividades antioxidantes, según el solvente empleado.

Del mismo modo, Milovanović y col., 2014 plantean que la capacidad antioxidante de los cuerpos fructíferos de las especies de *Pleurotus* han sido objeto de números estudios y obtienen valores de EC<sub>50</sub> en extractos etanólicos de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* y *P. ferulae* inferiores a 14 mg/mL y en extractos acuosos de *P. sajor-caju* de 9,0 a 10,4 mg/mL.

### 3.5.2- Estimación del Poder Reductor

La capacidad reductora de un compuesto puede servir como un importante indicador de su potencial actividad antioxidante. El método del poder reductor se basa en la capacidad de la sustancia que será evaluada de reducir las especies férricas (Fe<sup>3+</sup>) a ferrosas (Fe<sup>2+</sup>) 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 Reducing Power que es la empleada en nuestro trabajo, diferenciándose una de otra principalmente en la fuente de Fe<sup>3+</sup> que se adiciona al sistema (Shimada y col., 1992).

En este experimento, se realizó una medición espectrofotométrica a 700 nm, longitud de onda donde absorbe el complejo de Fe<sup>2+</sup> formado. El incremento de la absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de Fe<sup>3+</sup> reducido a Fe<sup>2+</sup> por la especie antioxidante evaluada. El poder reductor de los hongos comestibles medicinales podría estar relacionado con la capacidad de actuar como donantes de hidrógeno (Shimada y col., 1992).

En la figura 8 se muestran los valores del poder reductor del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* y del ácido ascórbico como compuesto antioxidante de referencia. Observándose que el poder reductor del extracto y del ácido ascórbico aumentan con el aumento de la concentración, por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de los extractos, aumenta la absorbancia a la longitud de onda de 700 nm, donde el incremento de la absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de Fe<sup>3+</sup> reducido a Fe<sup>2+</sup> por la especie antioxidante evaluada.

Al observar los resultados obtenidos, el extracto acuoso manifiesta un poder reductor inferior al del ácido ascórbico, resultado que es adecuado si se tiene en cuenta que el ácido ascórbico es empleado como patrón de referencia, pero si demuestra las potencialidades reductoras del extracto analizado.

En el experimento para estimar el poder reductor se obtuvo para la concentración de 1 mg/mL valores de absorbancia para el extracto de  $0,430 \pm 0,121$  y para el ácido ascórbico de  $0,743 \pm 0,09$ , valores comparados con los obtenidos por Im y col., 2014 en extractos acuosos a altas temperaturas de *P. florida* a 1 mg/mL de  $0,54 \pm 0,18$ .

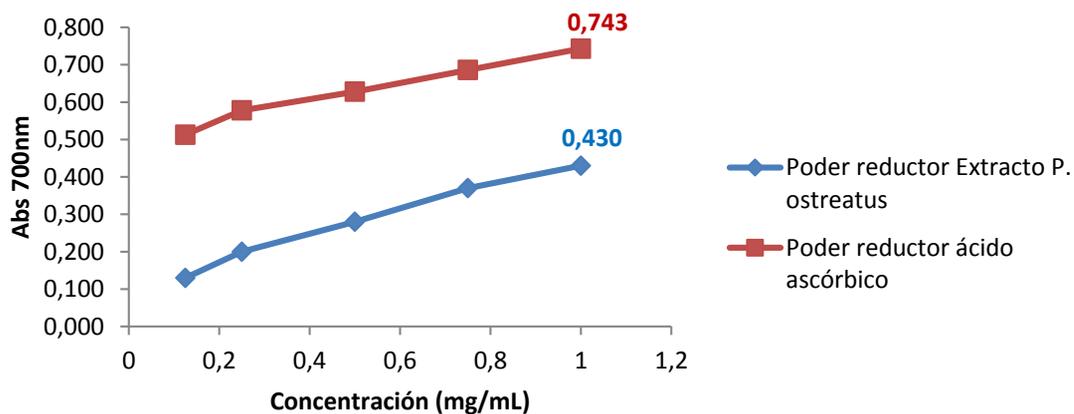
Los investigadores Jayakumar y col., 2009 reportaron a la concentración de 10 mg/mL en extractos etanólicos de *P. ostreatus*, valores de poder reductor de 1,367, los cuales al compararlos con valores obtenidos en *P. citrinopileatus* a la misma concentración, resultó de 1,05. Estos autores plantean que el poder reductor va a ser dependiente de la concentración, donde, a manera que aumenta la concentración, si posee capacidad reductora, aumentará la absorbancia.

Así mismo, los resultados de González-Palma y col., 2016 reportan que en todas sus muestras investigadas, el poder reductor depende de la concentración, a su vez obtienen el mayor valor de poder reductor para el extracto acuoso obtenido por decocción de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, con un valor de  $0,439 \pm 0,011$  a la concentración de 100 mg GAE/L.

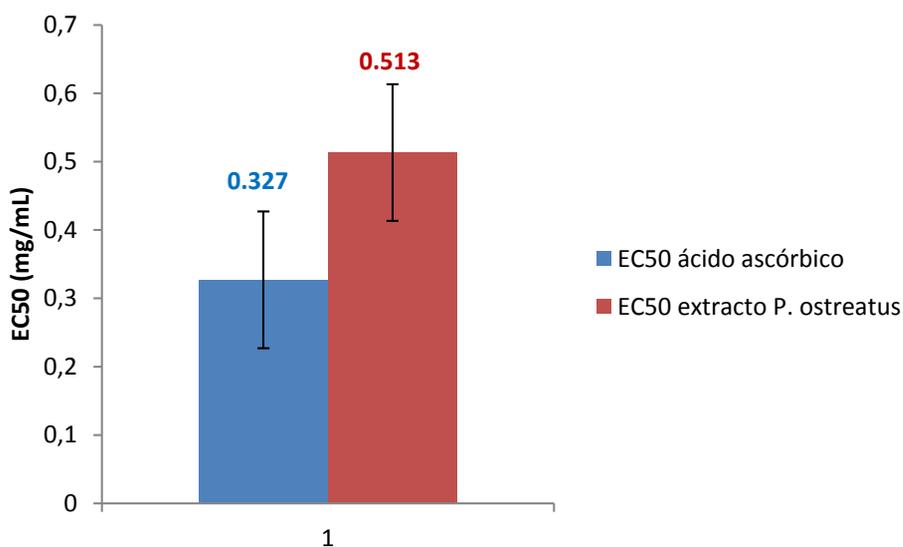
Los investigadores Arbaayah y Umi, 2013 obtuvieron en extractos etanólicos de varias especies de *Pleurotus* el mayor poder reductor a la concentración de 10 mg/mL para la variedad *P. djamor var. djamor*, con una absorbancia de 0,874, seguido de *P. djamor var. roseus* (0,771), *P. pulmonarius* (0,429) y finalmente *P. ostreatus* (0,397). Estos autores concluyen que el poder reductor de los iones  $Fe^{3+}$  mostrado por los extractos podría guardar relación con la presencia de compuestos que actúan como donadores de hidrógeno, 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, además que el poder reductor constituye un indicador del potencial antioxidante del compuesto evaluado.

Además, en la figura 9 se muestra el valor de  $EC_{50}$  en el ensayo del poder reductor que se refiere a la concentración a la que se alcanza el 50% de la absorbancia máxima. Donde, los valores de  $EC_{50}$  obtenidos resultaron para el ácido ascórbico de  $0,327 \pm 0,31$  mg/mL y para el extracto de *Pleurotus* de  $0,513 \pm 0,355$  mg/mL, observándose que el menor valor de  $EC_{50}$  se corresponde con el ácido ascórbico, como sustancia antioxidante de referencia, que se relaciona con la mayor capacidad antioxidante. Los resultados del  $EC_{50}$  no mostraron diferencias significativas estadísticamente para una  $p < 0,05$ .

Al respecto, Grifoll y col., 2015 en extractos metanólicos de *P. ostreatus* obtuvieron valores de  $EC_{50}$  para el poder reductor de  $2,74 \pm 0,32$  mg/mL.



**Figura 8.** Poder reductor para el ácido ascórbico y para el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.



**Figura 9.** Valores de concentración del extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* y del ácido ascórbico a la que se alcanza el 50% de la absorbancia máxima ( $EC_{50}$ ) en el ensayo de poder reductor. No existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los investigadores Jayakumar y col., 2011 plantean que la capacidad reductora de un compuesto puede servir como un indicador significativo de su potencial actividad antioxidante. Así mismo, las propiedades reductoras de una sustancia están generalmente asociadas con la presencia de reductores, como el ácido ascórbico, el cual ha sido reportado que ejerce su acción antioxidante por rompimiento de la cadena de radicales libres donando un átomo de hidrógeno.

### **3.5.3- Efectos del extracto acuoso de *P. ostreatus* en el modelo *in vitro* de peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón**

La peroxidación lipídica (POL) es un proceso generado por el efecto de las ERO. Las ERO provocan la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y los fosfolípidos de las membranas celulares, iniciando una reacción en cadena que resulta peligrosa para la viabilidad celular, fundamentalmente. Los procesos de POL conducen a la formación de numerosos derivados tóxicos: los hidroperóxidos, los 4-hidroxi-alquenos y el malondialdehído (MDA), entre otros, que dan como resultado la ruptura de la integridad de las membranas celulares, afectando su fluidez y permeabilidad (García y col., 2005).

Se han reportado en diversos estados fisiopatológicos como en enfermedades cardiovasculares, el cáncer, los trastornos neurodegenerativos e incluso en el envejecimiento, concentraciones elevadas de MDA, donde la oxidación de los lípidos o peroxidación lipídica, constituye un paso crucial (Janero, 1990). Los investigadores Arbaayah y Umi, 2013 comentan que los productos de la POL ejercen diversas funciones biológicas *in vivo* como su implicación en la regulación de la expresión génica, la señalización y activación de receptores, así como en las respuestas adaptativas. Por tanto, las investigaciones han centrado su atención en los productos de peroxidación lipídica para dilucidar el mecanismo de oxidación lipídica y su participación en la patogénesis de diversas enfermedades, el desarrollo de biomarcadores específicos y prácticos para diagnosticar enfermedades y evaluar terapias.

El indicador de la POL más extensamente utilizado es el MDA, especialmente la determinación mediante el ensayo espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (TBA), producto a que ofrece un medio fácil de evaluar la peroxidación lipídica en materiales biológicos (León y col., 2005; Gaschler y Stockwell, 2017).

En nuestro estudio se emplearon homogenatos de hígado y cerebro de ratón. En la figura 10 se muestra el porcentaje de inhibición de MDA en homogenatos de hígado de ratón para el extracto acuoso a altas temperaturas de *P. ostreatus* y para el ácido ascórbico como sustancia antioxidante de referencia. Donde se observa que el valor más alto en cuanto al porcentaje de inhibición de MDA para el ácido ascórbico y el extracto acuoso correspondió a la concentración de 20 mg/mL, obteniendo porcentajes de 68,07 y 51,54 respectivamente. El ácido ascórbico como sustancia antioxidante de referencia mostró una mayor capacidad inhibitoria comparada con el extracto en estudio.

Los resultados obtenidos para el extracto y el control positivo muestran que existe una relación directa entre la concentración y la inhibición de la POL, donde a medida que aumenta la concentración, aumenta el porcentaje de inhibición de la POL. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Jayakumar y col., 2009, donde plantean que a la concentración de 10 mg/mL del extracto de *P. ostreatus* ocurre una mayor inhibición de la POL, con un porcentaje de 56,20 en el extracto y 67,15 para el estándar de ácido ascórbico.

Existen diversos mecanismos implicados en el incremento de la POL en el tejido hepático, donde las ERO deterioran los lípidos de la membrana mitocondrial de los hepatocitos y con ello se afecta la cadena respiratoria y el genoma mitocondrial. Esto conduce a la generación de más ERO, produciéndose una reacción en cadena. La disfunción mitocondrial también puede provocar apoptosis o necrosis dependiendo del estado energético de la célula (Noeman y col., 2011).

Para el caso del homogenato de cerebro, en nuestro estudio se muestra en la figura 11, el porcentaje de inhibición de la POL para el extracto acuoso a altas temperaturas de *P. ostreatus* y para el ácido ascórbico como sustancia antioxidante patrón de referencia. Se observa que el porcentaje más alto a la concentración de 20 mg/mL, se corresponde para el ácido ascórbico (53,02) y para el extracto acuoso fue de 37,91. El ácido ascórbico como sustancia antioxidante de referencia mostró una mayor capacidad inhibitoria comparada con el extracto en estudio.

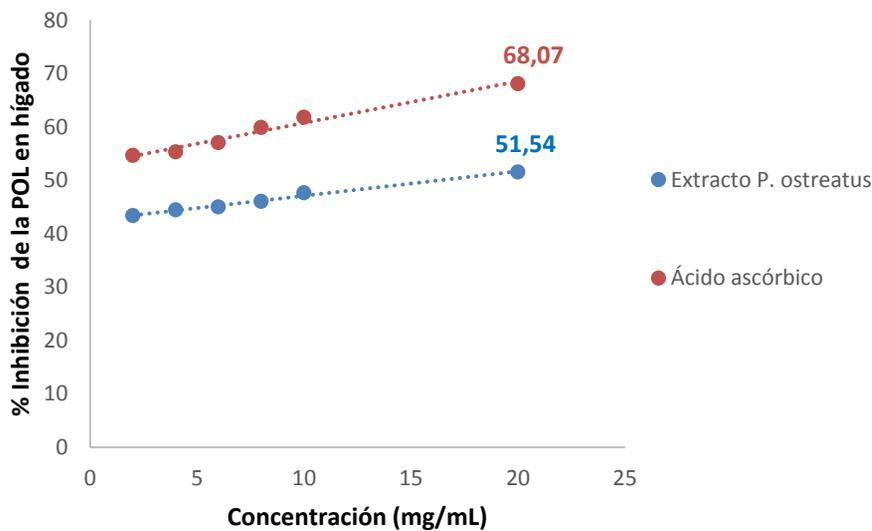
Los resultados obtenidos para el extracto y el control positivo muestran que existe una relación directa entre la concentración y la inhibición de la POL, donde a medida que aumenta la concentración aumenta el poder inhibitorio de la POL.

Los investigadores Cheung y Cheung, 2005 reportaron en homogenatos de cerebro de ratas, porcentajes de inhibición de la peroxidación lipídica de 50.09% y 50 %, por las especies *V. volvacea* y *P. flabellatus*, respectivamente.

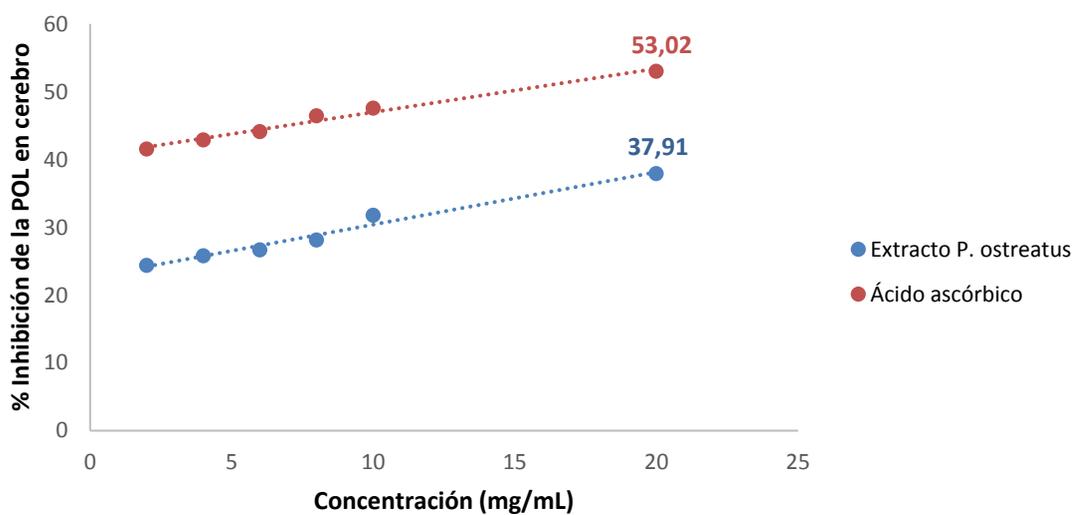
El cerebro, según García y col., 2005 es rico en fosfolípidos que pueden ser atacados por ERO e iniciar el proceso de POL, este ensayo se ha empleado para dilucidar la posible contribución de las ERO a daños cerebrales asociados a procesos crónicos como isquemias, hemorragias, traumatismos cerebrales, el Alzheimer y el Parkinson.

Se debe significar que se obtuvo una mayor protección por parte del extracto, a la concentración de 20 mg/mL en ambos tejidos, evidenciándose efectos antioxidantes de *P. ostreatus*. La disminución de POL más eficiente se observó en el tejido hepático con relación al cerebral, por consiguiente el extracto mostró un mejor comportamiento como hepatoprotector y menos como neuroprotector.

Estos resultados indican la capacidad del extracto de *P. ostreatus* para prevenir o disminuir el daño oxidativo a los lípidos en las membranas celulares de hígado y cerebro de ratón, todo lo cual puede contribuir al mantenimiento de la integridad y funcionalidad de estos dos importantes órganos.



**Figura 10.** Porcientos de inhibición de MDA para el ácido ascórbico y para el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* en homogenatos de hígado de ratón en el ensayo de POL.



**Figura 11.** Porcientos de inhibición de MDA para el ácido ascórbico y para el extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* en homogenatos de cerebro de ratón en el ensayo de POL.

### **3.6- Relación entre el contenido fenólico con la capacidad secuestradora del radical DPPH•, el poder reductor y la peroxidación lipídica**

Múltiples reportes dan cuenta de la relación directa entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total en los extractos de hongos comestibles-medicinales. Los compuestos fenólicos juegan un rol importante como antioxidantes y también contribuyen eficientemente a estabilizar los procesos de peroxidación lipídica (Jayakumar y col., 2011), de ahí la gran importancia que posee su presencia, para ser empleados estos hongos comestibles como suplementos nutricionales para el uso en diversas terapias. Lo anterior justificó que se evaluara la correlación del contenido fenólico con los ensayos antioxidantes realizados en la presente investigación.

En la figura 12 se muestra la correlación existente entre el contenido fenólico y la actividad secuestradora del radical DPPH• para el extracto acuoso a altas temperaturas, donde el valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) obtenido fue de 0,978. Esto evidenció una correlación relativamente fuerte entre el contenido de fenoles y la inhibición del radical DPPH•. El modelo de la recta reportó un valor elevado de  $R^2 = 0,957$ , ratificando la relación directa entre el contenido fenólico y la actividad antirradicálica.

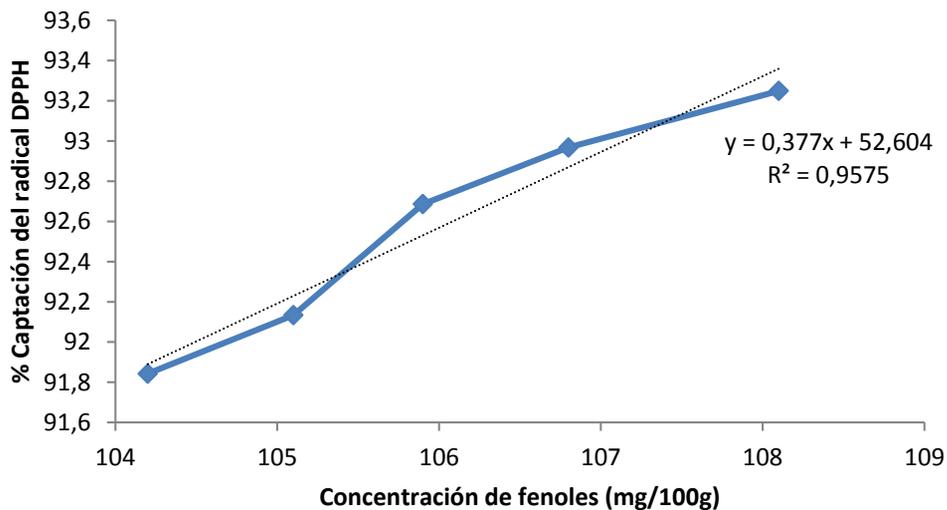
Numerosos investigadores, reportan que las mayores concentraciones de fenoles se asocian a una mayor captación del radical DPPH•. Otros como Sudha y col., 2012 refieren que la capacidad de captación de los extractos de setas podría estar condicionada por los componentes bioactivos que presentan, compuestos como los fenoles que pueden donar hidrógeno y captar el radical DPPH•, mecanismo relacionado con su actividad antioxidante.

La correlación existente entre el contenido fenólico y el poder reductor para el extracto evaluado se muestra en la figura 13, donde el valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) fue de 0,990. Esto evidencia una correlación relativamente fuerte entre estos dos aspectos. El modelo de la recta reportó un valor elevado de  $R^2 = 0,980$ , ratificando la relación directa entre el contenido fenólico y el poder reductor.

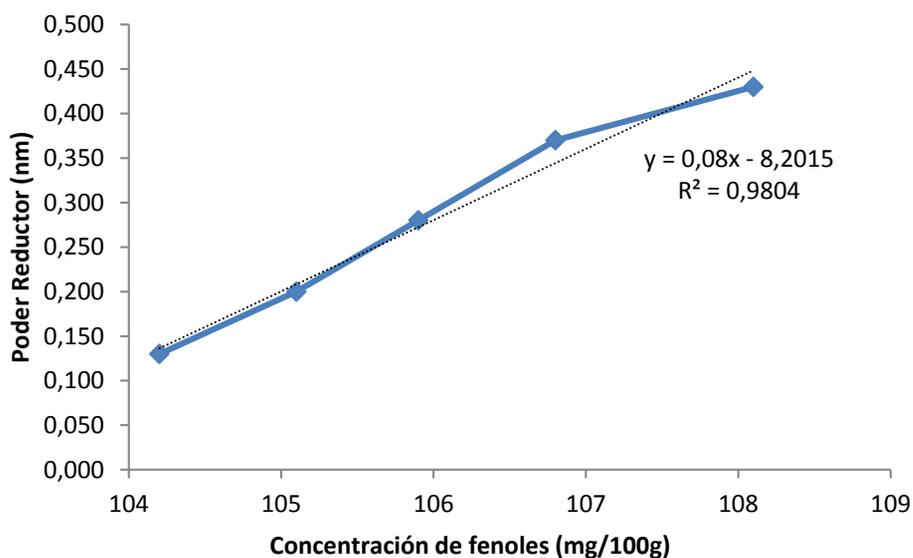
En este sentido, Abdullah y col., 2012 reportaron en la especie *P. ostreatus* una buena correlación entre los fenoles totales y la actividad de barrido del radical DPPH• ( $R^2=0,8181$ ), así como en el ensayo de poder reductor ( $R^2=0,8546$ ), sugiriendo que este potencial antioxidante es debido a la presencia de compuestos fenólicos.

La correlación existente entre el contenido fenólico y el ensayo de peroxidación lipídica en homogenatos de hígado de ratón se muestra en la figura 14, donde el valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) fue de 0,962, evidenciando una correlación relativamente fuerte entre el contenido de fenoles y el ensayo de POL. El modelo de la recta reportó un valor elevado de  $R^2=0,927$ , ratificando la relación directa entre ambos.

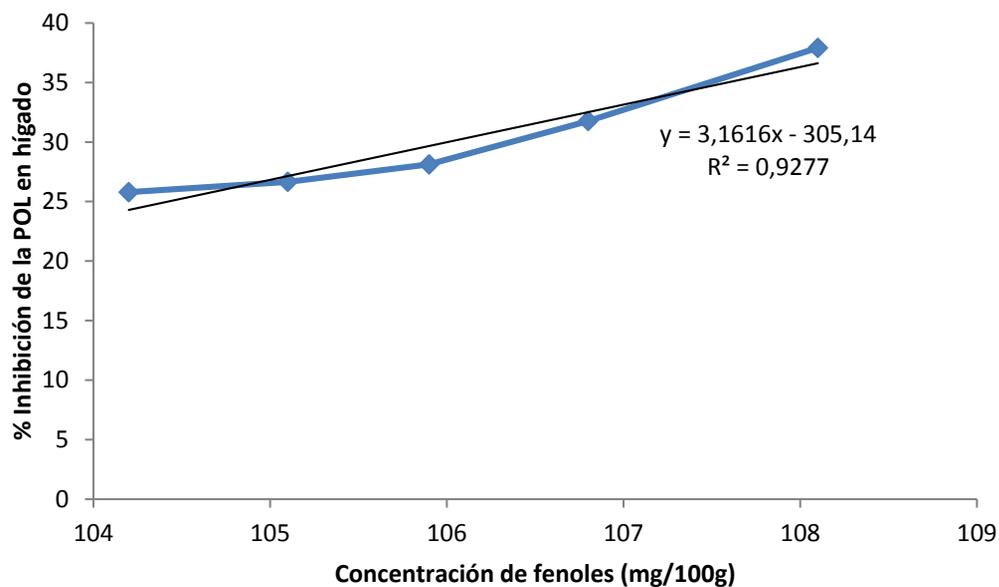
En la figura 15 se muestra la correlación entre el contenido fenólico y el ensayo de POL en homogenatos de cerebro de ratón, donde el coeficiente de correlación ( $r$ ) fue de 0,923, evidenciando una correlación moderadamente fuerte entre el contenido de



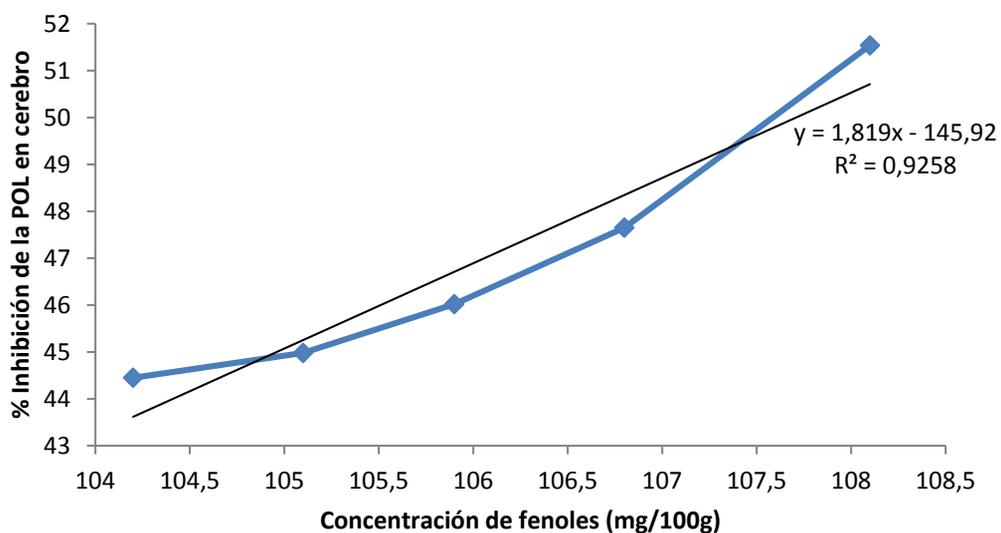
**Figura 12.** Correlación entre la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante de captación del radical DPPH• en el extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.



**Figura 13.** Correlación entre la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante en el ensayo de poder reductor en el extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*.



**Figura 14.** Correlación entre la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante en el ensayo de peroxidación lipídica en homogenatos de hígado de ratón.



**Figura 15.** Correlación entre la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante en el ensayo de peroxidación lipídica en homogenatos de cerebro de ratón.

fenoles y el ensayo de POL. El modelo de la recta reportó un valor elevado de  $R^2=0,925$ , ratificando la relación directa entre ambos ensayos.

Estos resultados muestran que la actividad antioxidante del extracto de *P. ostreatus* evidenciada en la inhibición de la peroxidación lipídica (POL), el secuestro de los radicales DPPH• y el poder reductor esta posiblemente asociada a su alto contenido de compuestos fenólicos.

### **3.7- Análisis del acoplamiento molecular de los fenoles con la proteína de estudio CYP2E1**

El estudio de acoplamiento molecular realizado con los fenoles seleccionados del hongo comestible-medicinal *Pleurotus ostreatus* (Tabla 1) y la proteína CYP2E1 se muestra en la Tabla 5. Los fenoles, muestran una elevada afinidad hacia la proteína, sustentado en los valores de energía de unión ( $\Delta G$ ) y la constante de inhibición ( $K_i$ ). Se observa que la mayoría de los compuestos fenólicos presentan una buena fortaleza de unión hacia la proteína CYP2E1 con valores de  $\Delta G$  entre -8,05 a -10,39 kcal/mol y de  $K_i$  entre  $1,26E-8$  a  $355,69E-10$  M.

Al analizar los resultados de las interacciones entre los 9 fenoles seleccionados y la proteína en estudio, se observa que los fenoles presentan una selectividad moderada, atendiendo a los valores de energía de unión y la constante de inhibición calculada, según la Figura 2.

Así mismo, se destacan en rojo, en la tabla 5, aquellos fenoles que tienen una afinidad superior por los correspondientes sitios activos de la proteína. Luego de este análisis, se constata que los ácidos cafeíco, ferúlico, homogentísico, *p*-hidroxibenzoico y protocatecúico poseen una buena selectividad con la proteína en estudio, al presentar los menores valores de  $K_i$  y  $\Delta G$ .

A continuación en la tabla 6, se realiza el análisis de las diferentes interacciones resultantes de los acoplamientos entre aquellos fenoles que mostraron mejor afinidad con la proteína estudiada. Se presentan las interacciones por puente de hidrógeno, donde la cisteína permite el anclaje del grupo hemo, así como las interacciones hidrofóbicas, señalándose con letra roja los aminoácidos que pertenecen al sitio activo de la proteína y que interaccionan con cada fenol.

Estos fenoles presentan interacciones con algunos de los residuos de aminoácidos que constituyen los sitios activos de la proteína reportados por Porubsky, 2008, ellos son: Ala<sup>299</sup>, Thr<sup>303</sup>, Val<sup>364</sup>, Leu<sup>368</sup> e Ile<sup>115</sup> en las interacciones hidrofóbicas. Estos investigadores refieren que Thr<sup>303</sup> constituye el sitio polar de la cadena altamente conservado, que orienta su unión al hidrógeno de los sustratos, planteando que una mutación de la Thr<sup>303</sup> por Ser, Val o Ala en ratones mostró cambios en la actividad de la CYP2E1, como una disminución en la hidroxilación de los ácidos grasos y alteraciones en el metabolismo de las isotiociantinas. Mutaciones en los aminoácidos Val<sup>364</sup> o Leu<sup>368</sup> incrementan la actividad de la 7-etoxi-4-trifluorometilcoumarina, pero disminuyen la

**Tabla 5.** Resultados del acoplamiento molecular entre los fenoles seleccionados con la proteína CYP2E1 en estudio.

Ligando	CYP2E1	
	$\Delta G$ (Kcal/mol)	Ki ( $\mu M$ )
<b>Ácido cafeico</b>	<b>-8.05</b>	<b>1.26</b>
Ácido <i>p</i> -cumárico	-9.01	248.6
<b>Ácido ferúlico</b>	<b>-8.27</b>	<b>2.32</b>
Ácido cinámico	-9.09	217.34
Ácido gálico	-8.80	355.65
<b>Ácido homogentísico</b>	<b>-10.39</b>	<b>24.41</b>
<b>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico</b>	<b>-10.25</b>	<b>30.73</b>
<b>Ácido protocatecuico</b>	<b>-9.81</b>	<b>64.52</b>
Ácido gentísico	-9.41	125.61

**Tabla 6.** Resultados de las interacciones de la proteína CYP2E1 en estudio con los fenoles que mostraron mejor afinidad.

Ligandos	PDBID	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ki ( $\mu M$ )	Interacciones hidrofóbicas	Por puente de hidrógeno
Ácido cafeíco	3e6i	-8.05	1.26	ALA 443; THR 304; THR 307; THR 303; PHE 430; LEU 296; GLY 439; <b>ALA 299</b> ; GLY 300; ALA 438; <b>VAL 364</b> ; PRO 429; ASN 367; LEU 393; <b>LEU 368</b> ; <b>ILE 115</b> ; ILE114.	CYS 437[S...HO]; HEM500[Fe...HO]
Ácido ferúlico	3e6i	-8.27	2.32	THR307; ALA443; PHE430; THR304; <b>ALA299</b> ; <b>THR303</b> ; LEU296; GLY439; GLY300; ASN367; <b>VAL364</b> ; LEU393; PRO429; <b>LEU368</b> ; ALA438; ILE114; <b>ILE115</b>	CYS 437[S...HO]; HEM500[Fe...HO]
Ácido homogentísico	3e6i	-10.39	24.41	THR304; THR307; <b>THR303</b> ; PHE430; <b>ALA299</b> ; ALA443; GLY439; LEU296; ALA438; GLY300; <b>VAL364</b> ; PRO429; ASN367; LEU393; <b>ILE115</b> ; ILE114; <b>LEU368</b>	CYS 437[S...HO]; HEM500[Fe...HO]
Ácido <i>p</i> - hidroxibenzoico	3e6i	-10.25	30.73	ALA443; THR307; PHE430; THR304; GLY300; <b>THR303</b> ; <b>ALA299</b> ; LEU296; ALA438; <b>ILE115</b> ; ILE114; <b>LEU368</b> ; LEU393; <b>VAL364</b> ; PRO429; ASN367; GLY439	CYS 437[S...HO]; HEM500[Fe...HO]
Ácido protocatecúico	3e6i	-9.81	64.52	THR304; ALA443; PHE430; <b>ALA299</b> ; GLY300; GLY439; LEU296; ILE114; ALA438; <b>ILE115</b> ; THR307; PRO429; <b>VAL364</b> ; ASN367; LEU393; <b>LEU368</b>	CYS437[S...HO]; HEM500[Fe...HO]

hidroxilación del *p*-nitrofenol por lo que juegan un rol importante en la especificidad de la proteína por el sustrato.

El compuesto de mejor energía de unión fue el ácido homogentísico, el cual presentó una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas (18) con la proteína CYP2E1. Este elemento es de interés, puesto que el ácido homogentísico fue uno de los fenoles detectados en la huella del HPLC en el extracto.

Al respecto, algunos investigadores como Medina y col., 2018 han referido, que el ácido homogentísico puede ser un buen candidato para la captación del radical 1-hidroxyetil y para la protección del hígado después del consumo de etanol.

Por otra parte, Valencia y Garín, 2010, refieren que ratas sometidas a una dieta con alcohol etílico y alimentadas con *P. ostreatus*, mostraron una protección de la estructura hepática de hasta el 40% en comparación con el grupo control.

Los fenoles ácidos cafeico, ferúlico, y *p*-hidroxibenzoico mostraron valores de interacción con el CYP2E1 muy cercanos entre ellos, además el número de interacciones hidrofóbicas fue similar (17), lo que sugiere que podrían tener comportamientos análogos, basado en sus estructuras moleculares.

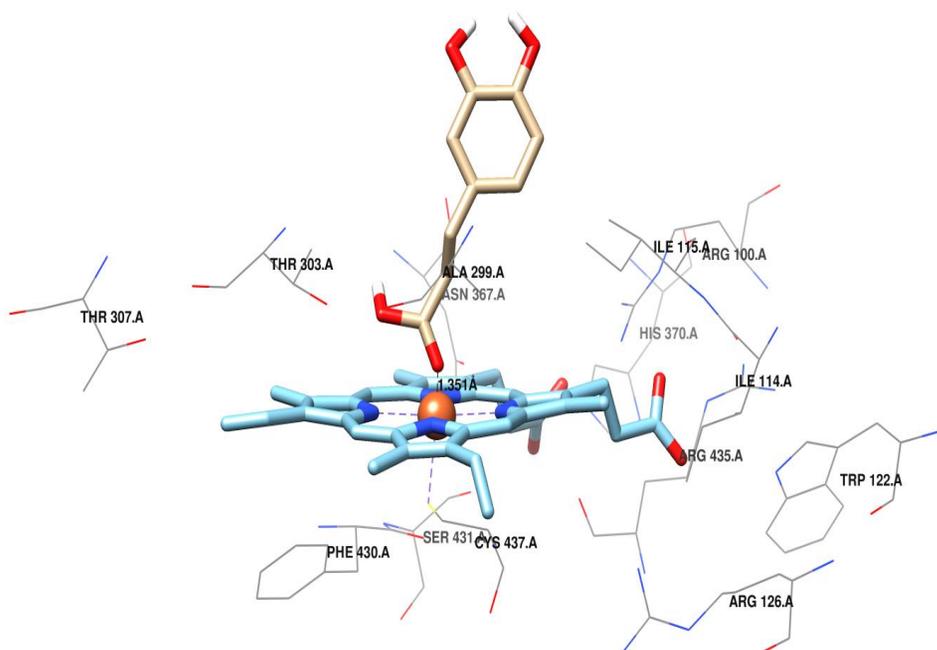
Los resultados de interacción entre los fenoles y la proteína de estudio se han representado usando imágenes 2D (software Ligplot), donde se muestran los tipos de interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno.

En la figura 16 se muestran las interacciones del ácido cafeico con la proteína CYP2E1. Investigadores como Beltrán y col., 2008, han reportado interacciones entre el ácido cafeico esterificado de propóleos de abeja (*Apis mellifera*) con isoformas de CYP, atribuyendo un efecto antihepatocarcinogénico.

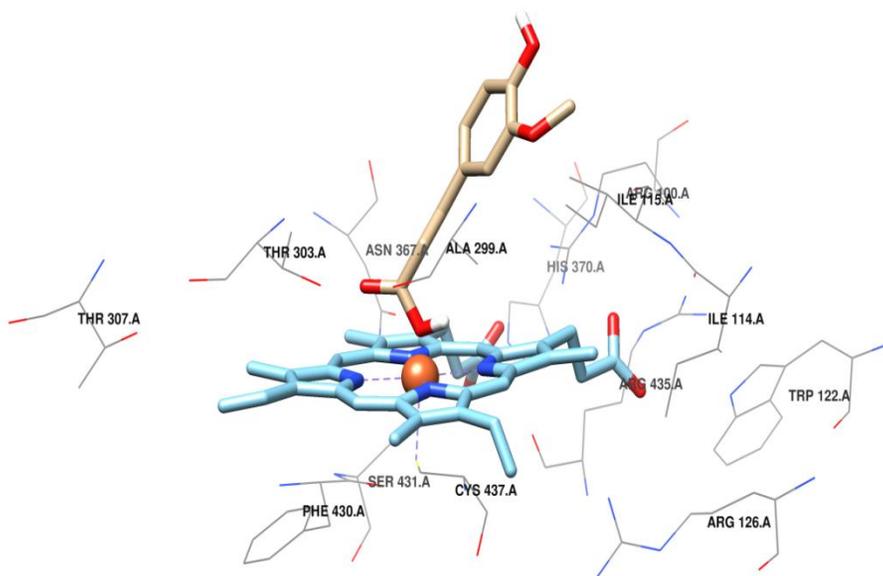
Además, Furuya y col, 2012, plantean que los CYP450 catalizan eficientemente la hidroxilación del ácido *p*-cumárico, por lo que podrían proveer una síntesis rápida de ácido cafeico en procesos biotecnológicos utilizando la *Escherichia coli*, lo cual resulta de interés por las propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antivirales que presenta el ácido cafeico.

También, en la figura 17, 18, 19 y 20, se muestran las interacciones de la proteína de estudio con el ácido felúrico, homogentísico, *p*-hidroxibenzoico y protocatecúico, respectivamente. En este sentido, algunos investigadores como Baer-Dubowska y col., 1998, reportan interacciones entre el ácido protocatecúico y diferentes formas de CYP450, explicando un posible mecanismo que justifica la acción anticarcinogénica de este fenol por medio de la inhibición o activación de las proteínas estudiadas.

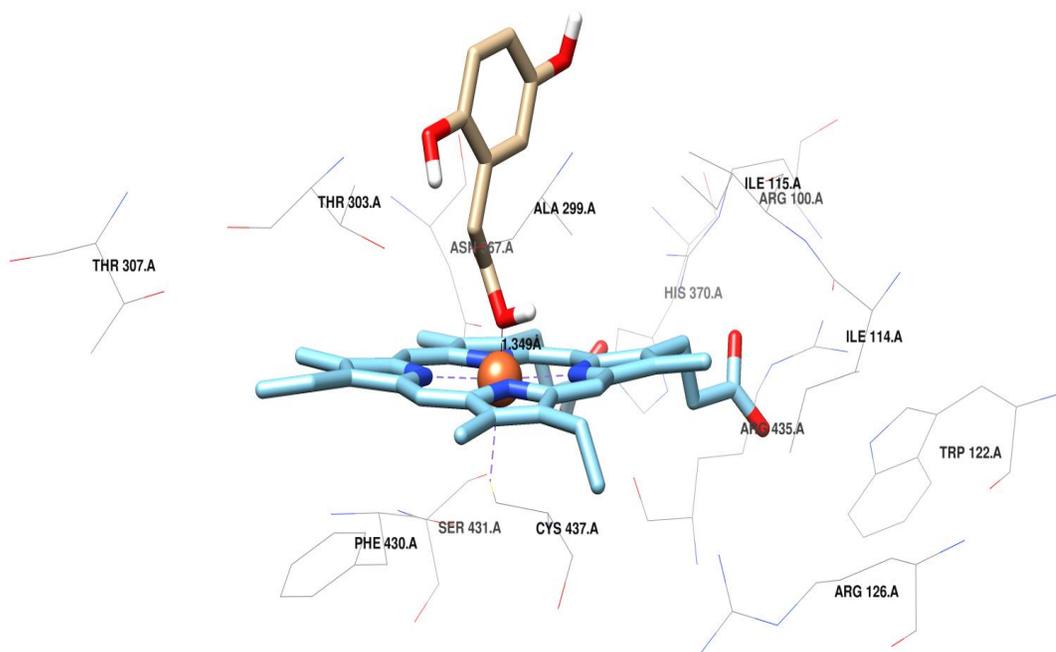
En un estudio realizado por Disotuar, 2018, se evaluó el efecto hepatoprotector de un biopreparado a bajas temperaturas, obtenido de cuerpos fructíferos de setas *Pleurotus* sp. en ratones con daño hepático inducido por malnutrición proteico energética. Los



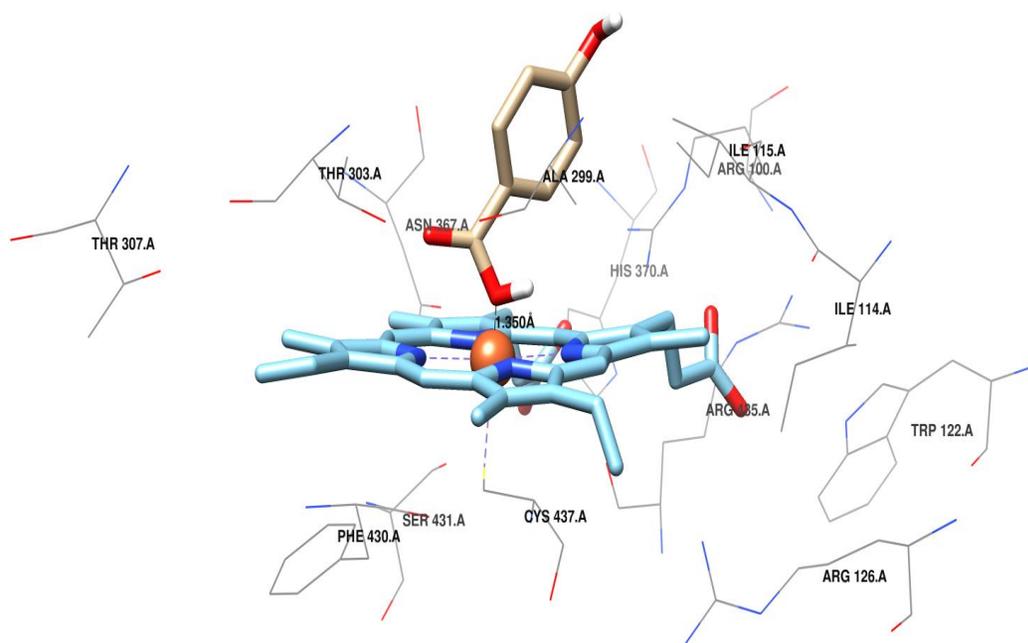
**Figura 16.** Interacciones por puente de hidrógeno del ácido cafeico con la proteína CPY2E1.



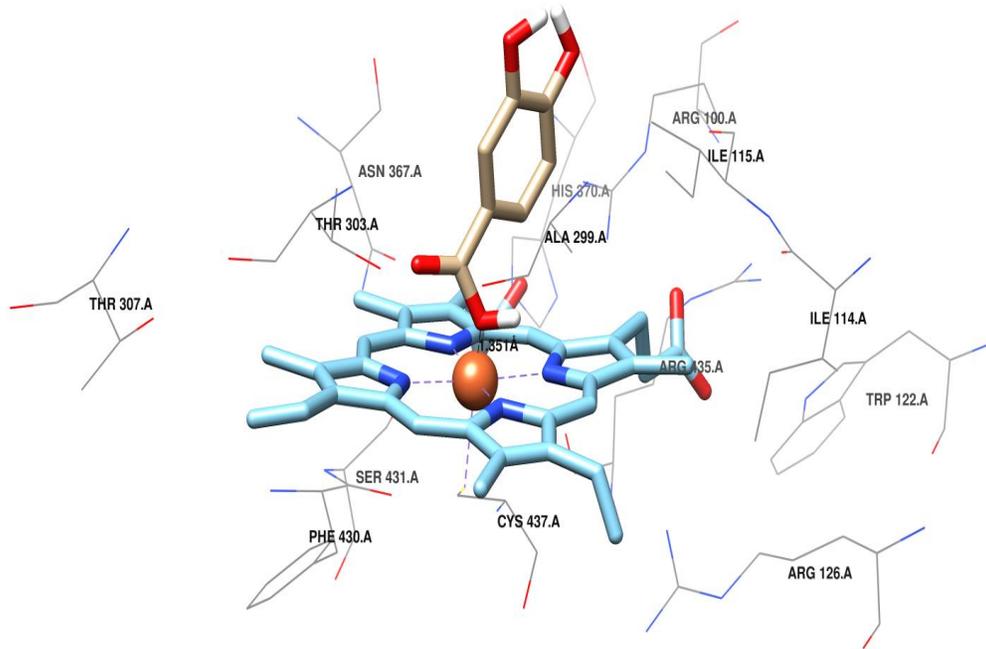
**Figura 17.** Interacciones por puente de hidrógeno del ácido ferúlico con la proteína de estudio CPY2E1.



**Figura 18.** Interacciones por puente de hidrógeno del ácido homogentísico con la proteína de estudio CPY2E1.



**Figura 19.** Interacciones por puente de hidrógeno del ácido *p*-hidroxibenzoico con la proteína de estudio CPY2E1.



**Figura 20.** Interacciones por puente de hidrógeno del ácido protocatecúico con la proteína de estudio CPY2E1.

resultados mostraron una marcada recuperación en el grupo que recibió el extracto de *Pleurotus* sp. con respecto al grupo malnutrido y al alimentado con dieta convencional; la reducción de la síntesis excesiva de urea a partir de los grupos amino de los aminoácidos, el restablecimiento adecuado del funcionamiento hepático con relación al catabolismo proteico, el restablecimiento de la funcionalidad de la enzima fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transferasa y la aminotrasferasa. Este bioproducto sugiere un efecto protector en los procesos metabólicos del hígado y la posibilidad de una correcta eliminación de fármacos y xenobióticos glutationados.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, son comparados con el reporte realizado por Morales, 2019, el cual emplea los mismos fenoles de la especie *Pleurotus ostreatus* y los acopla con las proteínas: 5-lipooxigenasa, NFkB/IkB $\alpha$ , NADPH-oxidasa y la ciclooxigenasa-2. En el estudio se obtuvieron valores de  $\Delta G$  entre -10.72 a -12.28 kcal/mol y de  $K_i$  entre 2.08E-8 a 9.99E-10 M. Señala además, que el ácido homogentísico, ácido clorogénico y ácido gentísico, son los que presentan mejores resultados en la interacción con los residuos del sitio activo de la proteína 5-lipooxigenasa.

El reconocimiento molecular desempeña un rol importante en la ejecución de eventos biomoleculares fundamentales como las interacciones enzima- sustrato, fármaco-proteína y fármaco-ácido nucleico. Para entender los principios generales que gobiernan la naturaleza de las interacciones (Van der Waals, enlace de hidrógeno, electrostática, entre otras) entre los ligandos y las proteínas o los ácidos nucleicos de interés. Además puede proporcionar un marco de trabajo para el diseño de fármacos con potencial terapéutico (Stevens, 2014).

Especial atención revisten los compuestos fenólicos, los cuales poseen valor medicinal (Alves y col., 2013). En este sentido, se conoce que los compuestos fenólicos son antioxidantes con propiedades redox, lo cual les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, captadores de radicales libres y queladores del oxígeno singlete (Dimitrios, 2006).

Al respecto, los investigadores Aguirre y col., 2018 realizaron estudios *in silico*, basados en la similitud estructural de micocompuestos de hongos comestibles medicinales de bajo peso molecular (fenoles), con respecto a sustancias y moléculas antitumorales con efectos moduladores en eventos epigenéticos. En particular, de siete compuestos de hongos estudiados, cinco mostraron un potencial efecto en la acetilación/desacetilación de histonas, y en el caso específico de *Pleurotus ostreatus*, se encontraron tres fenoles: ácido protocatecúico, mirecitina y naringina, con similitud estructural a veinte compuestos antitumorales de referencia, lo cual sugiere que estos compuestos pudieran actuar como antimetabolitos de DNA, antimitóticos y/o agentes alquilantes.

De manera general, la actividad antioxidante del extracto de *P. ostreatus* se ha evidenciado en la inhibición de la peroxidación lipídica (POL), el secuestro de los radicales DPPH• y la estimación del poder reductor, la cual puede estar posiblemente asociada a la presencia de compuestos fenólicos (Jayakumar y col., 2011). Los polifenoles pueden proporcionar una protección significativa *in vitro* contra el estrés

oxidativo, en concentraciones mucho más bajas de lo que sería necesario para la protección química antioxidante (Weichselbaum y Buttriss, 2010). Jayakumar y col. (2008) sugieren que los extractos de hongos comestibles expresan efectos antioxidantes a nivel de los genes del sistema de defensa antioxidante.

En función de los resultados obtenidos, se puede asumir que la evaluación *in silico* de los compuestos fenólicos de la seta comestible *Pleurotus ostreatus*, ha servido de punto de partida para futuras investigaciones ya sea *in vitro* o *in vivo*, referidas a la actividad antioxidante de este hongo comestible-medicinal.

Los estudios computacionales, como el acoplamiento molecular, constituyen una importante herramienta bioinformática para elucidar los mecanismos de unión de diferentes compuestos bioactivos derivados de estos hongos comestibles-medicinales, con proteínas de interés, de manera que se puedan obtener bioproductos más selectivos y potentes, dependiendo de la actividad biológica que se desea evaluar. Por otro lado, brindarían importante información para los futuros estudios preclínicos y clínicos.

## Conclusiones

- El procedimiento empleado mediante tratamiento térmico para la obtención del extracto acuoso a altas temperaturas de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, favoreció la liberación de compuestos fenólicos detectados en tamizaje fitoquímico, espectros UV-visible y por HPLC.
- La concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico en el extracto evaluado mostró valores de  $106 \pm 0,04$  mg/100g,  $2,8 \pm 0,92$  mg/100g y  $10,29 \pm 1,6$  mg/100g, respectivamente.
- El extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* mostró actividad antioxidante *in vitro* a través de los ensayos de captación del radical DPPH•, estimación del poder reductor e inhibición de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado y cerebro de ratón, pudiendo estar posiblemente asociada a la presencia de compuestos fenólicos.
- La fortaleza de unión de los diferentes compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* con la proteína CYP2E1, basado en parámetros químicos físicos presentan una buena fortaleza de unión con valores de  $\Delta G$  entre -8,05 a -10,39 kcal/mol y de  $K_i$  entre  $1,26E-8$  a  $355,69E-10$  M. Los fenoles con mejores resultados de interacción fueron los ácidos caféico, ferúlico, homogentísico, *p*-hidroxibenzoico y protocatecúico.

## Recomendaciones

-Profundizar en la evaluación de la actividad antioxidante del extracto objeto de estudio en modelos animales de patologías asociadas al estrés oxidativo.

-Evaluar la interacción de los fenoles seleccionados y otros compuestos presentes en *Pleurotus ostreatus* con otras dianas moleculares involucradas en el cáncer, mecanismos antiinflamatorios, enfermedades neurodegenerativas y metabólicas.

- Comparar los resultados de acoplamiento molecular con fármacos de referencia como hepato y neuro protectores.

## Referencias bibliográficas

- Abagyan R y Totrov M. (2001). High-throughput docking for lead generation. *Curr Opin Chem Biol*, 5:375-382.
- Abdullah, N., Ismail, S. M., Aminudin, N., Shuib, A. S., Lau, B. F. (2012). Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Adebayo, E. A., Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Escudero, H., Meneses, M. E., Bonilla, M. (2018). Comparative study of antioxidant and antibacterial properties of the edible mushrooms *Pleurotus levis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* and *P. tuber-regium*. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1316-1330.
- Aguirre R, Cutiño L, Peña J, Morris H, Beltran Y, Llauradó G, Gaime Perraud I. (2018). An in silico approach for evaluating the antitumor and epigenetic modulating potential of phenolic compounds occurring in edible and medicinal mushrooms. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* 5(1):6.
- Aksoy, L., Kolay, E., Ağılönü, Y., Aslan, Z., Kargioğlu, M. (2013). Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi journal of biological sciences*, 20(3), 235-239.
- Alam, N., Yoon, K. N., Lee, K. R., Shin, P. G., Cheong, J. C., Yoo, Y. B., Shim, J. M., Lee, M. W., Lee, U. Y., Lee, T. S. (2010). Antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of different extracts from *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Mycobiology* 38(4): 295–301
- Alispahić, A., Šapčanin, A., Salihović, M., Ramić, E., Dedić, A., Pazalja, M. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of mushroom extracts from Bosnian market. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 44, 5-8.
- Álvarez, J. (2009). Evaluación de algunos efectos inmunofarmacológicos de extractos hidrosolubles crudos del micelio de *Pleurotus spp.* Tesis en opción al Grado de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Cuba.
- Alves, M. J, FH, Abreu R M, A M, M P. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of applied microbiology* 2013, 115(2):346-357.
- Anantharaju, P. G, Gowda, P. C, Vimalambike, M. G, Madhunapantula, S. V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr J.* 2016; 15: 99
- Arbaayah, H. H., y Kalsom, Y. U. (2013). Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere*, 4(4), 661-673.

Arct, J., y Pytkowska, K. (2008). Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clinics in dermatology*, 26(4), 347-357.

Asociación Oficial de Métodos Químicos Analíticos (AOAC). (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists (17th edn), AOAC International, Gaithersburg, MD.

Atkovska, K., Samsonov, S. A., Paszkowski-Rogacz, M., Pisabarro, M. T. (2014). Multipose binding in molecular docking. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 2622-2645.

Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M. A., Fromenty, B. (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 35(10), 630-637.

AutoDock 4.2 y AutoDockTools 1.5.6. (1999). In: Michel F SP: A Programming Language for Software Integration and Development. *J Mol Graphics Mod*, 17:57-61.

Baer-Dubowska, W., Szaefer, H., Krajka-Kuzniak, V. (1998). Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*, 28(8), 735-743.

Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., Ribani, R. H. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus spp.* *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 633-646.

Beltrán, O., Alemán, L., Salcido, M., Hernández, S., Fattel, S., Arce, E., Villa, S. (2008). Evidence that the anticarcinogenic effect of caffeic acid phenethyl ester in the resistant hepatocyte model involves modifications of cytochrome P450. *Toxicological sciences*, 104(1), 100-106.

Berman, H. M., Bhat, T. N., Bourne, P. E., Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H., Westbrook, J. (2000). The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature structural biology*, 7(11), 957-959.

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

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologies*, 28, 25–30.

Çağlarımak, N. E. C. L. A. (2011). Edible mushrooms: an alternative food item. In *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*. pp 548-554.

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 377-399.

Carrasco-González, J. A., Serna-Saldívar, S. O., Gutierrez-Uribe, J. A. (2017). Mycochemical changes induced by selenium enrichment in *P. ostreatus* fruiting bodies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(20), 4074-4082

Carrillo, R., Díaz Ponce, J. A., Peña, C. A., Flores, O. I., Neri, R., Zepeda, A. D., Ortiz, A. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(1), 6-18.

Chang S. T y Buswell J. A. (2010). Safety, quality control and regulation aspects relating to mushroom nutraceuticals. *Proceed. 6th Int. Conf. Mush. Biol. Mush. Prod. WSMBMP. Bonn.*188-196.

Chem3D 15. 0 profesional. (2015). CambridgeSoftInc, Cambridge, MA.In.

ChemBioDraw Ultra. 15. 0 profesional. (2015). CambridgeSoftInc, Cambridge, MA. In.

Chen, Y. H., Xia, E. Q., Xu, X. R., Li, S., Ling, W. H., Wu, S., Li, H. B. (2012). Evaluation of benzo [a] pyrene in food from China by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *International journal of environmental research and public health*, 9(11), 4159-4169.

Cheung, L. M. y Cheung, P. C. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89(3), 403-409.

Cheynier, V. y Halbwirth, H. (2017). Polyphenols: Physicochemical and Biological Properties and Perspectives of Their Use in a Zero-Waste Society. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (31), 6343–6345.

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

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

Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Sylvain, J. F., Lacroix, M. (2010). Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(7), 666-679.

Cui, H., Wu, S., Sun, Y., Wang, T., Li, Z., Chen, M., Wang, C. (2016). Polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis* induces apoptosis via a mitochondrial pathway in HepG2 cells. *Food & function*, 7(1), 455-463.

Dandapat, S., y Sinha, M. P. (2015).Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Pleurotus tuber-regium* (Rumph. ex Fr.) Singer. *AdvBiol Res*, 9(3), 140-5.

De la Cruz, E. R. (2012). Determinación de las potencialidades antioxidantes de *Pleurotus* sp in vitro a partir de extractos hidrosolubles [Online]. Disponible en Internet: <https://www.researchgate.net/publication/325319392> [Links].

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

Devi K. S, Roy B, Patra P, Sahoo P, Islam S. S, Maitia T (2015) Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. *Carbohydr. Polym.* 94:857-865.

Dimitrios B. (2006). Sources of natural phenolics antioxidants. *Trends in Food, Science and Technology* 2006, 17:505-512.

Disotuar, D. (2018). Efecto hepatoprotector de un biopreparado de *Pleurotus* sp. en ratones BALB/c con daño hepático inducido por malnutrición. Tesis en opción al Grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Cuba.

Dundar, A., Okumus, V., Ozdemir, S., Celik, K. S., Boga, M., Ozcagli, E., Yildiz, A. (2015). Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and anticholinesterase activities of seven mushroom species with their phenolic acid composition. *Journal of Horticulture*, 1-6.

Ebigwai, J. K., Edu, E. A., Itam, E. H., Mofunanya, A. J. (2012). Activity of crude cold-water extract of the culinary-medicinal oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (higher Basidiomycetes), and timolol maleate on induced ocular hypertension. *International journal of medicinal mushrooms*, 14(5).

Edet, U. O., Ebana, R. U. B., Etok, C. A., Udoidiong, V. O. (2016). Nutrient profile and phytochemical analysis of commercially cultivated oyster mushroom in Calabar, South-South Nigeria. *Advances in research*, 7(3), 1-6.

Elbatrawy, E. N., Ghonimy, E. A., Alassar, M. M., Wu, F. S. (2015). Medicinal mushroom extracts possess differential antioxidant activity and cytotoxicity to cancer cells. *International journal of medicinal mushrooms*, 17(5).

El-Enshasy, H. A., Selvamani, S., Dailin, D. J., Malek, R. A., Hanapi, S. Z., Ambehabati, K. K., Moloji, N. (2018). Antioxidant Compounds of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 7(1), 1-14.

Espín, S., Sánchez-Virosta, P., García-Fernández, A. J., Eeva, T. (2017). A microplate adaptation of the thiobarbituric acid reactive substances assay to determine lipid peroxidation fluorometrically in small sample volumes. *Revista de Toxicología*, 34(2), 94-98.

Fernandes, A., Barros, L., Martins, A., Herbert, P., Ferreira, I. C. (2015). Nutritional characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. *Food Chemistry*, 169, pp. 396-400.

Fernández, A. G., de Sande García, M. A., Fernández, A. M. M., Ramos, S. B., y Galán, M. J. G. (2011). Aspectos fundamentales del Citocromo P450. FUNDACIÓN TEJERINA. [Online]. Disponible en Internet: [http://cardiacos.net/wp-content/uploads/2015/05/aspectos\\_fundamentales\\_citocromo.pdf](http://cardiacos.net/wp-content/uploads/2015/05/aspectos_fundamentales_citocromo.pdf) [Links].

Ferreira, I. C., Barros, L., Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543-1560.

Finkel, T., y Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239.

Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. (2011). Using molecular docking to investigate the anti-breast cancer activity of low molecular weight compounds present on wild mushrooms. SAR and QSAR. *Environmental Research* 2011, 22(3-4):315-328. 99

Furuya, T., Arai, Y., Kino, K. (2012). Biotechnological production of caffeic acid by bacterial cytochrome P450 CYP199A2. Appl. *Environ. Microbiol.*, 78(17), 6087-6094.

Garcia, Y. J., Rodríguez-Malaver, A. J., y Peñaloza, N. (2005). Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of neuroscience methods*, 144(1), 127-135

Gaschler, M. M., y Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425.

Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., Niedzielski, P. (2016). Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology*, 242(5), 723-732.

Gil-Ramírez A, Pavo-Caballero C, Baeza E. (2016). Mushrooms do not contain flavonoids. *J Funct Foods* 2016; 25: 1-13.

Glamočlija, J. y Sokovic, M. (2017). Fungi an source with huge potential for “mushroom pharmaceuticals”. *Lekovitesirovine*, 37, 52-57.

Gogavekar, S. S., Rokade, S. A., Ranveer, R. C., Ghosh, J. S., Kalyani, D. C., Sahoo, A. K. (2014). Important nutritional constituents, flavour components, antioxidant and antibacterial properties of *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of food science and technology*, 51(8), 1483-1491.

González-Palma I., Escalona H. B., Ponce E. (2016). Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. *Front Microbiol*; 7: 1099.

Grattagliano, I., Bonfrate, L., Diogo, C.V., Wang, H., Wang, D., Portincasa, P. (2009). Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: Certainties and doubts. *World J Gastroenterol*. 15(39): 4865-4876.

Grifoll, V., Tello, M. L., Roncero-Ramos, I., Pérez, M. (2014). Poder antioxidante de hongos cultivados en La Rioja. *Actas de Horticultura: XIII Jornadas del Grupo de Horticultura y I Jornadas del Grupo de Alimentación y Salud*, 65, 59-64.

Guía metodológica para la investigación en plantas medicinales. Editorial Pueblo y Educación, La Habana; 1997. MINSAP.

Gunawardena, D., Bennett, L., Shanmugam, K., King, K., Williams, R., Zabarar, D., Münch, G. (2014). Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  activated murine macrophages. *Food chemistry*, 148, 92-96.

Harbone J. B. (1984) "Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall, London 270-284.

Hassan, M. A. A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T. W., Tiralongo, J. (2015). Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7802-7838.

Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Ferreira, I. C. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119(4), 1443-1450.

Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Foodchemistry*, 173, 501-513.

Hernández, D. R., Barrera Morín, V., Briz Tena, O., Herrera, G., Abril, E., Laguna Maldonado, K. D., Matuz Mares, D. (2019). El papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 62(3), 6-19.

Huang, H. Y., Korivi, M., Yang, H. T., Huang, C. C., Chaing, Y. Y., Tsai, Y. C. (2014). Effect of *Pleurotus tuber-regium* polysaccharides supplementation on the progression of diabetes complications in obese-diabetic rats. *Chin. J. Physiol*, 57, 198-208.

Ighodaro, O. M. y Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.

Im, K. H., Nguyen, T. K., Shin, D. B., Lee, K. R., Lee, T. S. (2014). Appraisal of antioxidant and anti-inflammatory activities of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*. *Molecules*, 19(3), 3310-3326.

Islam, T., Ganesan, K., Xu, B. (2019). New Insight into Mycochemical Profiles and Antioxidant Potential of Edible and Medicinal Mushrooms: A Review. *International journal of medicinal mushrooms*, 21(3), 237-251.

Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free radical biology and medicine*, 9(6), 515-540.

Jaworska, G., Pogoń, K., Bernaś, E., Duda-Chodak, A. (2015). Nutraceuticals and Antioxidant Activity of Prepared for Consumption Commercial Mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Food Quality*, 38(2), 111-122.

Jayakumar, T., Thomas, P. A., Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 228-234.

Jayakumar, T., Thomas, P. A., Isai, M., Geraldine, P. (2010). An extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, increases catalase gene expression and reduces protein oxidation during aging in rats. *Zhong xi yijie he xuebao= Journal of Chinese integrative medicine*, 8(8), 774-780.

Jayakumar, T., Thomas, P. A., Sheu, J. R., Geraldine, P. (2011). In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food research international*, 44(4), 851-861.

Jia, Z., Tang, M., Wu, J. (1999). *Food Chem* 64:555–559

Jonathan S. G, Okon C. B, Oyelakin A. O (2012). Nutritional values of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq.Fr.) Kumm. cultivated on different agricultural wastes. *Nat Sci.*; 10(9): 186–91.

Kanagasabapathy, G., Chua, K. H., Malek, S. N. A., Vikineswary, S., Kuppusamy, U. R. (2014). AMP-activated protein kinase mediates insulin-like and lipo-mobilising effects of  $\beta$ -glucan-rich polysaccharides isolated from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.), Singer mushroom, in 3T3-L1 cells. *Food chemistry*, 145, 198-204.

Khan, M. A. y Tania, M. (2012). Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview. *Food Reviews International*, 28(3), 313-329.

Khan, M., MijanurRahman, M., Tania, M., Uddin, M., Ahmed, S. (2011). *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus florida* mushrooms improve some extent of the antioxidant systems in the liver of hypercholesterolemic rats. *The Open Nutraceuticals Journal*, 4(1).

Kim, J. H., Kim, S. J., Park, H. R., Choi, J. I., Ju, Y. C., Nam, K. C., Lee, S. C. (2009). The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. *J Med Plants Res*, 3(12), 1016-1020.

Kirk, P., Cannon, P., David, J. and Stalpers, J. (eds) (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, CABI. Google-Books-ID: IFD4\_VFRDdUC.

Kitchen D. B, Decornez H, Furr J. R, Bajorath J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Drug Discovery*, 3.

Klein, B. P., y Perry, A. K. (1982). Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47, 941–948.

Knop, D., Yarden, O., Hadar, Y. (2015). The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, pp.1025 -1038.

Kolayli, S., Sahin, H., Aliyazicioglu, R., Sesli, E. (2012). Phenolic components and antioxidant activity of three edible wild mushrooms from Trabzon, Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(1), 137-140.

Kongkla, K. y Poeaim, S. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of crude methanolic extract from five *Pleurotus* species. *Technology*, 12(7.1), 1455-1462.

Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., Van Griensven, L. (2015). Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10), 19489-19525.

Kumar, S. y Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J* 2013: 162750.

León, J., Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2005). Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of pineal research*, 38(1), 1-9.

Leung, T. M., y Nieto, N. (2013). CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 58(2), 395-398.

Li, S. y Shah, N. P. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Food chemistry*, 165, 262-270.

Ligplot(1996). In: AccCari Wallace RAL: Ligplot: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng*:127-134.

Llauradó, G., Beltrán, Y., Morris, H. J., Marcos, E., Diaz, U., Marcos, J., Cos, P. (2020). Restoration of liver function in malnourished mice orally administered with *Pleurotostreatus* fruiting bodies extract. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 8(1), 32-42.

Llauradó, G., Morris, H. J., Tamayo, V., Lebeque, Y., Beltrán, Y., Marcos, J., Bermudez, R. C. (2015). Haematopoiesis radioprotection in Balb/c mice by an aqueous mycelium extract from the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Natural product research*, 29(16), 1557-1561.

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.*, 224, 164–175.

Maftoun, P., Johari, H., Soltani, M., Malik, R., Othman, N. Z., El Enshasy, H. A. (2015). The edible mushroom *Pleurotus spp.*: I. Biodiversity and nutritional values. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 4(2), 67-83.

Magdaleno, C. 2014. Efecto de dos sustratos en la productividad y calidad nutricional del hongo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm. Trabajo de Diploma, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro México. pp

Mata, G., Salmenes, D., Savoie J. M. (2017). Las enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus spp.* En: Sánchez J. E, Royse D. J (eds) La biología, el Cultivo y las Propiedades Nutricionales y Medicinales de las Setas *Pleurotus spp.* El Colegio de la Frontera Sur. Chiapas, México. 63-77

Medina, M. E., Galano, A., Trigos, A. (2018). On the scavenging ability of homogentisic acid and ergosterol towards free radicals derived from ethanol consumption. *J Physical Chem B* 122(30): 7514–7521.

Menaga, D., Ayyasamy, P. M., Rajakumar, S., Sureshbabu, A., Rubalakshmi, G. (2013). Phytochemical studies, antioxidant activities and identification of active compounds using GC-MS of *Pleurotus florida* mushroom. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3(7), 5141-5149.

Meza-Menchaca, T., Suárez-Medellín, J., Del Ángel-Piña, C., Trigos, Á. (2015). The amoebicidal effect of ergosterol peroxide isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy research*, 29(12), 1982-1986.

Milovanović, I., Stajić, M., Čilerdžić, J., Stanojković, T., Knežević, A., Vukojević, J. (2014). Antioxidant, antifungal and anticancer activities of Se-enriched *Pleurotus spp.* mycelium extracts. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1379-1388.

Miras, M. y Gualix, J. (2009). Polimorfismo de los citocromos P-450. Importancia fisiopatológica y farmacológica. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

Mitra, P., Mandal, N. C., Acharya, K. (2016). Polyphenolic extract of *Termitomyces heimii*: antioxidant activity and phytochemical constituents. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 11(1), 25-31.

Modi, H. A., Parihar, S., Pithawala, E. A., Jain, N. K. (2014). Preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of wild edible mushrooms collected from Mahal forest of dang district, Gujarat, India. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 3(8), 1164-1174.

Morales, I. (2019). Evaluación *in silico* de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* con proteínas del balance redox. Tesis en opción al Grado de Licenciado en Ciencias Químicas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Cuba.

Morris, H. J, Bermúdez, R. C., Llauradó, G., Beltrán, Y., García, N. (2014). Mushroom Science In Cuba: Towards New Opportunities For Developing Functional

Foods/Nutraceuticals. *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8) 2014.*

Morris, H. J., Llauradó, G., Beltrán, Y., Lebeque, Y., Bermudéz, R. C., Garcia, N., Gaime-Perraud, I. and Moukha, S. (2017). The Use of Mushrooms in the Development of Functional Foods, Drugs, and Nutraceuticals, in I. C. F. R. Ferreira, P. Morales and L. Barros (eds), *Wild Plants, Mushrooms and Nuts*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 123–157.

Mruthunjaya, K. y Hukkeri, V. (2008). In vitro Antioxidant and free radical scavenging potential of *Parkinsonia aculeata* L. *Phcog Ma*, 4(13): 42-51.

Muszynska B, Sulkowska-Ziaja K, Ekiert H. (2013). Phenolic acids in selected edible basidiomycota species: *Armillariella*, *Boletus badius*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus*. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus* 2013, 12:107-116. 8

Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K., Gdula-Argasińska, J. (2018). Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food chemistry*, 243, 373-381.

Myburgh, K. H. (2014). Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress?. *Sports Medicine*, 44(1), 57-70.

Naczki, M., y Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

Naguib, Y. M., Azmy, R. M., Samaka, R. M., Salem, M. F. (2014). *Pleurotus ostreatus* opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen-induced hepato-renal injury. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 494.

Niki, E. (2016). Oxidative stress and antioxidants: distress or eustress?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 595, 19-24.

Noeman, S. A., Hamooda, H. E., Baalash, A. A. (2011). Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & metabolic syndrome*, 3(1), 17.

Obodai, M., Ferreira, I. C., Fernandes, Â., Barros, L., Mensah, D. L. N., Dzomeku, M., Takli, R. K. (2014). Evaluation of the chemical and antioxidant properties of wild and cultivated mushrooms of Ghana. *Molecules*, 19(12), 19532-19548.

Ochoa, A., López, T, Colombat, M. (2000). Farmacognosia y Química de los productos naturales. Monografía. Cuba 2000: 14-15, 15-30 p.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

Oke, F. y Aslim, B. (2011). Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food chemistry*, 128(3), 613-619.

Oloke J. K y Adebayo E. A. (2015) Effectiveness of immunotherapies from oyster mushroom (*Pleurotus species*) in the management of immunocompromised patients. *Int. J. Immunol.* 3:8-20.

Orellana, M. y Guajardo, V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, 132(1), 85-94.

OSORIO E. Aspectos básicos de Farmacognosia. 2009.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44.6, 307–315.

Ozen, T., Darcan, C., Kaygusuz, Ö., Turkecul, İ. (2016). The Chemical Content, Antioxidant and Antimicrobial Assays of *Lactarius controversus* and *Lactarius musteus*: Two Edible Wild Mushrooms from Giresun Province of Turkey. *Annals of Food Processing and Preservation*.

Padilla, J. y Rojo. A. (2002). Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVI (2002)

Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., Arrigo, M. D., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E. and Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* 128(3): 674-678.

Patel, P., Patel, D., y Natvarlal, P. (2012b). Experimental investigation of anti-rheumatoid activity of *Pleurotus sajorcaju* in adjuvant-induced arthritic rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(4), 269-274.

Patel, Y., Naraian, R., Singh, V. K. (2012a). Medicinal properties of *Pleurotus species* (Oyster mushroom): a review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3, 1-12.

Patlevič, P., Vašková, J., Švorc Jr, P., Vaško, L., Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integrative medicine research*, 5(4), 250-258.

Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Huang, Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed research international*, 2014.

Peraza, J. G., Grycz, A., Mederos, M. A. P., Galdón, B. R., Rodríguez, E. M. R. (2019). Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in *Pleurotus Spp.* Grown on Commercial and Wild Substrates. *J FoodNutri: IJFN-116*.

Pérez-Martínez, A. S., Acevedo-Padilla, S. A., Bibbins-Martínez, M., Galván-Alonso, J., Rosales-Mendoza, S. (2015). A perspective on the use of *Pleurotus* for the development of convenient fungi-made oral subunit vaccines. *Vaccine*, 33(1), 25-33.

Pineda, J. A. 2014. Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). Tesis de Doctorado en Ciencias

Técnicas, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Camagüey. Camagüey. 126 pp.

Piska, K., Sułkowska-Ziaja, K., Muszyńska, B. (2017). Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom)—its dietary significance and biological activity. *Acta Sci. Pol., HortorumCultus*, 16(1), 151-161.

Pisoschi, A. M. y Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.

Porubsky, P. R., Meneely, K. M., y Scott, E. E. (2008). Structures of human cytochrome P-450 2E1 insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33698-33707.

Puntel, R. L., Roos, D. H., Paixão, M. W., Braga, A. L., Zeni, G., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. T. (2007). Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyldiselenide and diphenylditelluride. *Chemico-biological interactions*, 165(2), 87-98.

Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 9764-9772.

Quevedo, L. E. 2016. Análisis comparativo del manejo tradicional y técnico del cultivo de setas (*Pleurotus ostreatus*), en la comunidad Pacto Sumaco, parroquia JatunSumaco, cantón Archidona. Trabajo de Diploma, Repositorio Universidad Nacional de Loja. Ecuador. pp.

Raman, J., Reddy, G. R., Lakshmanan, H., Selvaraj, V., Gajendran, B., Nanjian, R., Sabaratnam, V. (2015). Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles from *Pleurotus djamor var. roseus* and their in vitro cytotoxicity effect on PC3 cells. *Process Biochemistry*, 50(1), 140-147.

Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., Yadav, U. C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. *Life sciences*, 148, 183-193.

Rathore, H., Prasad, S., Sharma, S. (2017). Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* 5, 35-46.

Royse, D.J.; Baars; J., Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. En: Zied, D.C., Pardo-GiménezA. (eds.), *Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications*. John Wiley and Sons-Blackwell, Nueva York. pp. 5-13.

Royse, J. D y Sánchez, J. E. (2017). Producción mundial de setas *Pleurotus spp.* con énfasis en países iberoamericanos. En: Sánchez JE, Royse DJ (eds) *La biología, el Cultivo y las Propiedades Nutricionales y Medicinales de las Setas Pleurotus spp.* El Colegio de la Frontera Sur. Chiapas, México. 1-9

Saavedra, O. M., Vázquez, E. N. J., Vargas, M. R. B. G., Reyes, G. M. C. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. [Online]. Disponible en Internet: <http://reini.utcv.edu.mx/handle/123456789/876> [Links].

Sakamoto, Y. (2018). Influences of environmental factors on fruiting body induction, development and maturation in mushroom-forming fungi. *Fungal Biology Reviews*, 32(4), 236-248.

Sánchez, C. (2017a). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(1), 13-22.

Sánchez, C. (2017b). Bioactives from mushroom and their application. In *Food bioactives* (pp. 23-57). Springer, Cham.

Sánchez, V y Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *RevInvestMed Sur Mex*, 20(3), 161-168.

Shahidi, F y Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods*. 18:757-781.

Shamtsyan, M. (2016). Potential to develop functional food products from mushroom bioactive compounds. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 15, 51-59.

Sharma O. P, Bhat T. K (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113:1202-1205.

Sharma, S. K., Atri, N. S., Joshi, R., Gulati, A., Gulati, A. (2012). Evaluation of wild edible mushrooms for amino acid composition. *Acad. J. Plant Sci*, 5(2), 56-59.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., y Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6), 945-948.

Sies, H. y Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1315S-1321S.

Slinkard, K. y Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55.

Sorice, A., Guerriero, E., Capone, F. (2014). Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. *Mini Rev Med Chem* 2014; 14(5): 444-52.

Stevens E. (2014). Medicinal chemistry: the modern drug discovery process; 2014.

Sudha, G., Vadivukkarasi, S., Shree, R. B. I., Lakshmanan, P. (2012). Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 661-668.

Sun, S., Ai, L., Zhang, H., Weng, C., Lai, C., Liu, L. (2017). Enhanced production of pleurotulin by *Pleurotus mutilus* and study on its molecular structure. *Food chemistry*, 230, 350-353.

Teplyakova, T. y Kosogova, T. (2015). Fungal bioactive compounds with antiviral effect. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(8), 357.

UCSF Chimera. (2010). En: Thomas Ferrin CH, Couch G, Pettersen E, Goddard T, Meng E, Yang Z, Weber D, Greenblatt D, Muñoz V, Pintilie G. San Francisco: University of California.

Urquiza-Martínez, M. V. y Fenton-Navarro, B. (2016). Antioxidant Capacity of Food. *Free Radicals & Antioxidants*, 6(1).

Üstün, N. Ş., Bulam, S., Pekşen, A. (2018). The use of mushrooms and their extracts and compounds in functional foods and nutraceuticals. *Türkmen, A.(ed.)*, 1, 1205-1222.

Valverde M. E, Hernández-Pérez, T, Paredes-López, O (2015) Edible Mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, Article ID 376387, 14 pages.

Vamanu, E. (2013). Antioxidant properties and chemical compositions of various extracts of the edible commercial mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Revista de Chimie*, 64(1), 49-54.

Villarejo, A. D. (2004). Citocromo P-450: Reactividad, estructura y mecanismo de acción. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. [Online]. Disponible en Internet: <http://analesranf.com/index.php/mono/article/download/528/546> [Links].

Wasser, S. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical journal*, 37(6).

Weichselbaum, E., Buttriss, J. L: (2010). Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, 35(2):157-164.

Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Vinković, D. M., Jhoti, H. (2003). Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*, 424(6947), 464-468.

Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Vinković, D. M., y Jhoti, H. (2003). Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*, 424(6947), 464-468.

Woldegiorgis, A. Z., Abate, D., Haki, G. D., Ziegler, G. R. (2014). Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food chemistry*, 157, 30-36.

Wu, G. H., Hu, T., Li, Z. Y., Huang, Z. L., Jiang, J. G. (2014). In vitro antioxidant activities of the polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Food chemistry*, 148, 351-356.

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Li, H. B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96.

Xue, Z., Li, J., Cheng, A., Yu, W., Zhang, Z., Kou, X., Zhou, F. (2015). Structure identification of triterpene from the mushroom *Pleurotus eryngii* with inhibitory effects against breast cancer. *Plant foods for human nutrition*, 70(3), 291-296.

Yahaya, N. F. M., Rahman, M. A., Abdullah, N. (2014). Therapeutic potential of mushrooms in preventing and ameliorating hypertension. *Trends in food science & technology*, 39(2), 104-115.

Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P., Bahadoran, Z. (2015). Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian journal of sports medicine*, 6(1).

Yildiz, O., Can, Z., Laghari, A. Q., Şahin, H., Malkoç, M. (2015). Wild edible mushrooms as a natural source of phenolics and antioxidants. *Journal of Food Biochemistry*, 39(2), 148-154.

Zheng, Y., Pang, H., Wang, J., Shi, G., Huang, J. (2015). New apoptosis-inducing sesquiterpenoids from the mycelial culture of Chinese edible fungus *Pleurotus cystidiosus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(2), 545-551.