

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y  
FARMACIA

**Nutracéutica de *Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.)  
Maire**

Trabajo de Graduación

Presentado por  
Diana Elizabeth Pinagel Cifuentes  
Para optar al grado de  
Maestría

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de  
Plantas Medicinales  
MUPLAM

Guatemala, Noviembre de 2009

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Oscar Manuel Cóbar Pinto, PhD	DECANO
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	SECRETARIO
Licda. Lillian Raquel Irving Antillon, M.A.	VOCAL I
Licda. Liliana Vides De Urizar	VOCAL II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	VOCAL III
Br. Maria Estuardo Guerra Valle	VOCAL IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	VOCAL V

**CONSEJO ACADÉMICO**  
**ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Dr. Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D.  
Licda. Anne Marie Liere de Godoy, MSc.  
Dr. Jorge Luis De León Arana, PhD  
Dr. Jorge Erwin López Gutiérrez, PhD  
Lic. Félix Ricardo Véliz Fuentes, MSc.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a:

Dios Todopoderoso,

Mi madre, Laura Marina Cifuentes de Pinagel,

La Universidad de San Carlos de Guatemala.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al claustro de profesores de la Maestría en Uso y Manejo de Plantas Medicinales, por su entusiasmo, esfuerzo y dedicación en su labor.

A Osberth Morales y a Roberto Cáceres, por su apoyo en la colecta e identificación de los hongos.

A Keila y a Isa, por su apoyo en la realización de las pruebas de actividad antimicrobiana

Al Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, a LIPRONAT, al Departamento de Fisicoquímica y al Departamento de Química Orgánica, por el apoyo con materiales, reactivos y equipo.

A mi asesor, Dr. Óscar Cobar, y a mi revisor del trabajo, Dr. Francisco Pérez Sabino, por su orientación y sugerencias.

A mis amigos y a todas aquellas personas que me brindaron su colaboración de manera desinteresada.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Definición del problema	5
4. Justificación	6
5. Marco teórico	
5.1 Generalidades	7
5.2 Morfología del cuerpo fructífero de un Basidiomiceto	7
5.3 Hongos comestibles	8
5.4 Generalidades de la especie	8
5.5 Valor nutricional de los hongos	10
5.6 Nutraceuticos	11
5.7 Nutraceuticos en hongos	14
6. Objetivos	17
7. Hipótesis de trabajo	17
8. Metodología	
8.1 Universo y población	18
8.2 Obtención de la muestra	18
8.2.1 Tratamiento y conservación de los ejemplares	18
8.2.2 Preparación de la muestra objeto de estudio	19
8.3 Repeticiones y diseño estadístico	19
8.4 Materiales	19
8.5. Métodos	
8.5.1 Análisis proximal	20
8.5.2 Nutraceuticos	21
8.5.3 Actividad antimicrobiana	21
9. Resultados	22
10. Discusión de Resultados	23
11. Conclusiones	29
12. Recomendaciones	30
13. Referencias	31
14. Anexos	36

## 1. RESUMEN

Se evaluó la composición de nutrientes y el contenido de fenoles totales, flavonoides y vitamina C en el hongo *Agrocybe cylindracea* recolectado en cuatro lugares diferentes del departamento de San Marcos, Guatemala: Aldea Santa Irene, Aldea Santa Rita y Cantón Tojchiná, del municipio de San Antonio Sacatepéquez, y el caserío Monterrey, Aldea Santa Teresa, del municipio de San Pedro Sacatepéquez.

El análisis proximal de la muestra de *Agrocybe cylindracea* mostró que el hongo contiene, en porcentaje calculado sobre la muestra seca, 19.23% de proteína, 14.57% de fibra cruda, 1.24% de grasa cruda, 10.97% de ceniza y 41.29% de carbohidratos totales. Estos resultados indican que el contenido de estas sustancias en el hongo está dentro de los rangos reportados para los macrohongos comestibles en general y que el hongo es una buena fuente de macronutrientes y de bajo contenido energético: 234.18 kcal/100 g hongo seco.

Los nutraceuticos investigados son polifenoles totales, flavonoides y vitamina C, y los resultados demuestran que el contenido de estas sustancias le confiere al hongo valor como un alimento que puede resultar beneficioso para la salud por su contenido de antioxidantes.

El extracto acuoso de los cuerpos fructíferos del hongo no presentó actividad antimicrobiana frente a ninguno de los siguientes organismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* y la levadura *Candida albicans*.

Se recomienda continuar con la investigación sobre las propiedades antioxidantes del hongo, evaluando esta actividad con pruebas específicas, así como investigar su contenido de azúcares solubles y fibra dietética, el perfil de ácidos grasos y aminoácidos presentes en el hongo, sustancias importantes como nutraceuticos.

## 2. INTRODUCCIÓN

El término *nutracéutico* fue acuñado en 1989 por Stephen DeFelice, uniendo las palabras nutrición y farmacéutico, y para comprender bien su significado debe entenderse antes el término *alimento funcional*, que se define como aquel alimento que al ser consumido provee al cuerpo la cantidad requerida de los nutrientes necesarios para su supervivencia saludable. Un *nutracéutico* puede definirse como un alimento funcional que ayuda en la prevención o tratamiento de enfermedades o desórdenes distintos a la anemia. Un alimento puede ser funcional para una persona y nutracéutico para otra, por ejemplo, los frutos cítricos.

Las setas se han consumido como alimento desde hace siglos y en Oriente han sido también empleados como medicina, también desde hace largo tiempo. Existen al menos 5000 especies de hongos, de las cuales solamente algunas han sido estudiadas adecuadamente, de manera que su valor medicinal se ha respaldado con evidencia científica. Entre estas especies están *Ganoderma lucidum* (reishi), *Lentinus edodes* (shiitake), *Grifola frondosa* (maitake), *Agaricus blazei* (Hime-matsutake), *Pleurotus ostreatus* (hongo ostra). En los últimos 15 años, el interés en las setas por su valor nutracéutico ha ido aumentando, así como el valor económico de los productos derivados de ellas.

En Guatemala se encuentra una gran diversidad de hongos, comestibles y no comestibles. Uno de ellos es el *Agrocybe cylindracea*, que es una especie comestible consumida en China, Italia y México, entre otros países y que es consumida en Guatemala por personas de la etnia Mam y Kaqchikel.

El análisis proximal del hongo mostró que su contenido de macronutrientes se encuentra en el rango reportado para otros hongos comestibles. Presenta fenoles totales, flavonoides y vitamina C que son compuestos con conocida actividad antioxidante, beneficiosa para el organismo. No presentó actividad antimicrobiana contra los microorganismos ensayados.

### 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los macrohongos se consideran una fuente de nutrientes de calidad, aunque el contenido proporcional de proteínas, grasas, carbohidratos y otras sustancias nutritivas es variable, dependiendo de la especie y otros factores, como el cultivo. En Guatemala, es común encontrar en los mercados del área rural, vendedores de hongos colectados de poblaciones silvestres y uno de estos hongos es el *Agrocybe cylindracea* u hongo del sauco. El valor nutricional de este hongo encontrado en Guatemala no ha sido determinado aún, y en consecuencia no se cuenta con una base para la promoción del mismo como un alimento, y tampoco se conoce la concentración de algunos metabolitos secundarios en los cuerpos fructíferos con respecto al micelio. La presencia de ciertos metabolitos secundarios tiene interés desde el enfoque de alimento funcional, y los estudios llevados a cabo con anterioridad sobre hongos recolectados o cultivados en Guatemala no han determinado estas sustancias, por lo que este estudio sería el primero con este enfoque, sobre este género y especie.

El cultivo de hongos no necesariamente se ve limitado a la producción de cuerpos fructíferos que se comercializan como alimento humano, sino también puede producirse micelio en medios líquidos, con el fin de obtener luego un polvo nutritivo que puede aprovecharse de diferentes maneras. Es de esperarse que el micelio, al ser la parte del hongo que debe enfrentar mayor competencia frente a otros organismos para lograr desarrollarse, posea mayor cantidad de algunas sustancias químicas consideradas metabolitos secundarios, que le servirán al hongo como protección o defensa y que se consideran nutraceuticas por sus efectos beneficiosos sobre la salud, cuando son consumidas como alimentos.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala se han llevado a cabo varios proyectos de investigación relacionados con la producción artesanal de hongos comestibles, a partir de cepas silvestres colectadas en el país (Bran 2004, Andrade 2007). Sin embargo, son escasos los estudios sobre la composición nutricional y de compuestos considerados nutraceuticos en esos hongos (Castillo, 1989; Pérez, 1990). *Agrocybe cylindracea* se colecta de poblaciones silvestres para su consumo y actualmente está en desarrollo la investigación para su producción artesanal, por ello, es importante contar con datos del valor nutricional de este hongo silvestre, para luego poder compararlo con el de hongos cultivados, ya que las condiciones de cultivo, manejo, sustrato, etc., pueden modificar la composición de los hongos.

Además, al contar con los datos de composición nutricional y de nutraceuticos se tendrá un respaldo para el cultivo y comercialización de especies de hongos comestibles poco conocidos por la población del país y para el desarrollo de productos a partir de estos hongos, que tengan mayor valor agregado.



## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Generalidades de los hongos:

Los hongos forman parte del Reino Fungi, un grupo taxonómico independiente de los vegetales y los animales. Son organismos heterótrofos, inmóviles, poseen talos unicelulares o filamentosos rodeados por paredes celulares y se reproducen por esporas sexuales y asexuales. Pueden clasificarse de acuerdo al tamaño de las fructificaciones que producen, en macrohongos y microhongos, aunque algunos microhongos no producen fructificaciones (Guzmán, 2003). Se clasifican en cuatro phyla: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota.

Los hongos tienen un papel importante en los ecosistemas y son cruciales en la descomposición, reciclamiento y transporte de nutrientes. Algunas especies son patógenas de plantas, animales y humanos, y otras nos han proporcionado antibióticos. Su importancia industrial radica en su uso en la elaboración de cerveza, fermentaciones industriales y alimento (Guzmán, 2003). Los hongos comestibles se consideran macrohongos y se encuentran principalmente en el grupo Basidiomycota, denominado así porque los cuerpos fructíferos poseen basidios, estructuras microscópicas especializadas sobre las cuales se producen las esporas (basidiosporas) (Aldana Martínez, 2000).

### 5.2 Morfología del cuerpo fructífero de un Basidiomiceto

El cuerpo fructífero de un Basidiomiceto está formado por las siguientes estructuras:

**Píleo o sombrero:** es la porción superior más ensanchada, situada encima del pie. Presenta una gran variedad de formas y colores.

**Velo universal o envoltura:** escamas que recubren parcialmente al sombrero

**Cutícula, piel o epidermis del sombrero:** Está debajo de las escamas y es la membrana exterior que recubre al sombrero y pie. Es de gran valor en sistemática, tanto por su estructura como por su coloración.

**Himenóforo:** está en la parte inferior del píleo y contiene al himenio. Su forma y color son importantes para la identificación del hongo.

Himenio: es la parte fértil del Basidiomiceto y es donde se encuentran las esporas.

Estípite o pie: vástago que sirve de sostén al sombrero. Puede ser recto o curvado; cilíndrico, bulboso, claviforme o ensanchado en la parte superior; granuloso o fibroso y puede llevar en la parte superior un resto de la membrana anular llamada anillo (Arrabal, s.f).

Anillo: es un residuo de una cubierta protectora del himenio antes de la maduración.

Volva: parte residual del velo universal, que rodea la base del pie (Arrabal, s.f):

### **5.3 Hongos comestibles:**

Se conocen desde la prehistoria y hay culturas que les tienen más aprecio que otras, como la cultura china, en donde se estima que se dio el primer intento por cultivar hongos, hace aproximadamente 1,400 años. La primera especie cultivada fue *Auricularia auricula*. Los griegos y romanos consumían hongos y los romanos tenían especial predilección por un hongo que actualmente se conoce como *Amanita caesarea* u hongo del César, ya que a la realeza romana le gustaba mucho. En Guatemala se le conoce con el nombre de Hongo de San Juan (Bran y colaboradores, 2003).

Los aztecas conocían más de 50 especies de hongos, en su mayoría comestibles. Los mayas también los conocían y existe evidencia de su uso como alimentos o medicina, además de usarlos ceremonialmente, aunque esta última costumbre ha desaparecido (Gómez Pompa, 2003). Las piedras hongo encontradas en Guatemala están asociadas con ceremonias religiosas relacionadas con la fertilidad. (Lowry, 1971). A partir de estudios de Argueta (1981) y Sommerkamp (1984) se conoció la existencia de más de 45 especies de hongos comestibles en Guatemala. (Pérez, 1990; Bran y colaboradores, 2003)).

### **5.4. Generalidades de la Especie**

#### *Agrocybe cylindracea* (DC.) Gillet

Es un hongo comestible ampliamente distribuido y reportado en todos los continentes, aunque es raro en Norteamérica (Watling, 1992).

Existen variaciones morfológicas macro y microscópicas observadas en los diferentes especímenes recolectados. Entre estas características se encuentran la coloración del pileo y el número de esporas sobre el basidio (Uhart y Albertó, 2007).

#### Taxonomía:

Reino: *Fungi*. Phylum: *Basidiomycota*. Clase: *Agaricomycetes*. Subclase: *Agaricomycetidae*. Orden Agaricales. Familia: *Strophariaceae*. Género: *Agrocybe*. Especie: *cylindraceae*.

#### Sinonimias:

Posee más de 20 sinónimos, el más difundido y conocido es *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer. Otras sinonimias. *Agrocybe cylindraceae* (De Candolle ex Fries) Maire; *Agrocybe cylindracea* sensu Taylor; *Pholiota aegerita* (V.Brig.)Qué; *Pholiota capistrata* (Cooke)Sacc; *Agaricus aegerita* Fr, *Agaricus aegerita* V Brig; *Agaricus cylindracea* (DC)Gillet; *Agaricus cylindraceus* DC; *Agaricus leochromus* (Cooke) Sacc; *Agaricus pudicus* sensu Cooke; *Agrocybe cylindrica* (DeCandolle:Fr) Marie; *Pholiota cylindracea* (DC) Gillet; *Pholiota leochroma* (Cool) Sacc; *Pholiota pudica* sensu Rea; *Togaria cylindracea* (DC) Romagn. (Index Fungorum, 2009)

#### Nombres comunes:

En Guatemala: hongo del saúco, hongo del soico, Tx' Yol B'aqman, Tx' Yol te chib'j (idioma Mam), Rukoxil Tunay Che' (idioma Kaqchikel). (Bran y colaboradores, 2004)

En otros países: hongo de chopo, hongo negro del álamo, (México); seta del chopo (España) Pholiote du peuplier (Francia); cogumelo des choupos (Galicia); pollancró (Cataluña), makal ziza (País vasco); piopparello, pioppino (Italia); black poplar mushroom, chestnut mushroom (EE.UU); Yanagi-Matsutake, Yambushitake (Japón), zhuzhuang-tiantougu (China) (Stamets, P., sin fecha)

Hábitat: saprobio, lignícola, gregario. Crece sobre troncos de árboles vivos o muertos, en ramificaciones o heridas, cerca de la base. Se ha encontrado sobre *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Ulmus*, *Hacer*, *Melia*, *Robinia*, *Broussonetia*, *Allophylus*, *Cupania*, *Phebe*,(Uhart y Albertó, 2007) *Araucaria augustifolia*. (Watling, 1992) Es cosmopolita (Uhart y Albertó, 2007), en

Guatemala se encuentra creciendo sobre *Sambucus sp* y *Salix sp*, encontrado en los Departamentos de San Marcos y Chimaltenango (Bran et al 2004)

#### Descripción de *Agrocybe cylindracea*

##### Características macroscópicas y microscópicas del basidiocarpo

Píleo: de 2 a 14 cm, aunque puede alcanzar 20 cm de diámetro, hemisférico y con márgenes enrollados y regulares en ejemplares jóvenes y que al madurar se expande y entonces los márgenes muestran grietas; suave y de coloración café dorado, más oscuro en el centro, al madurar los bordes son más claros. De olor agradable.

Estípite: central, puede ser grueso o delgado, cilíndrico, firme, fibroso, puede tener de 3 a 15 cm de largo y 0.5 a 3 cm de diámetro. De color blanco a ocre y posee un anillo membranoso muy bien desarrollado, persistente, que usualmente se torna café al caer las esporas. Su sabor se ha descrito como de corcho o madera de barril.

El himenio tiene láminas delgadas y numerosas lamélulas decurrentes. De color crema al inicio, tornándose café tabaco al madurar las esporas. Se encuentra adherido al estípite.

Esporas de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de largo por 4.5 a 7  $\mu\text{m}$  de ancho, elípticas, color café tabaco o café chocolate opaco y en ocasiones ocre cuando se encuentran en grupos; carece de poro germinativo distintivo. Pueden presentar basidios tetraesporicos. (Uhart y Albertó, 2007)

#### **5.5 Valor nutricional de los hongos:**

Los análisis de composición (análisis proximal) de los hongos indican que los hongos comestibles son ricos en proteínas y carbohidratos, moderados en fibra y cenizas y bajos en lípidos, teniendo estos últimos una buena relación insaturados-saturados (Greene, 1990). Son una buena fuente de aminoácidos esenciales, sobre todo lisina, ciertas vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina y vitamina B2) y minerales, como el magnesio, potasio y fósforo.

En estudios realizados sobre el valor nutricional de los hongos, se reporta que la variedad botánica, el procesamiento y el tratamiento son determinantes en la composición proximal

(Manzi, Aguzzi, Pizzoferrato, 2001), aunque los valores de la composición de un alimento no siempre son una buena indicación de su valor nutricional, ya que la digestibilidad de los componentes varía en ellos, y también varían las técnicas analíticas empleadas para la determinación de la composición, lo que puede limitar la comparación de resultados. (Boa, 2004)

La FAO reconoce a los hongos silvestres como una fuente valiosa de alimento, con tres factores de importancia clave (Boa, 2004):

- Constituyen una fuente de alto valor nutricional, que puede asociarse a beneficios en la salud. La colecta de hongos en épocas de crisis puede aportar un alimento valioso a la dieta de las personas que viven en comunidades cercanas a los bosques.
- Son una fuente de ingresos extra para los recolectores, sobre todo en los países en desarrollo. La obtención de tales ingresos constituye un incentivo para mantener los bosques en vez de talarlos para convertirlos en tierra de cultivo.
- Las especies de hongos asociadas a los árboles son beneficiosas para éstos, ya que favorecen su crecimiento y contribuyen a mantener la salud de los bosques.

## **5.6 Nutracéuticos**

El término “nutracéutico” fue acuñado en 1989 por el médico Stephen DeFelice, que lo definió como “un alimento (o parte de un alimento) que provee beneficio médico o a la salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de una enfermedad” (Kalra, 2003). El término se logró por la unión de “nutrición” y “farmacéutico”, pero no tiene una regulación definida, aunque se emplea ampliamente en mercadeo de productos. Se puede comprender más la definición del término, aclarando lo que se entiende por un alimento funcional, el cual es aquel alimento que al ser consumido provee al cuerpo la cantidad requerida de los nutrientes necesarios para su supervivencia saludable, mientras que un nutracéutico ayuda en la prevención o tratamiento de enfermedad(es) o desorden(es), con excepción de la anemia. Un suplemento nutricional está diseñado para ser consumido en forma de cápsula, pastilla, tableta o en forma líquida y no como un alimento, y puede ser una o cualquier combinación de las siguientes sustancias: vitamina, mineral, aminoácido, hierba u otro componente botánico (concentrado, metabolito, constituyente o extracto), y su objetivo es suplementar la dieta incrementando la ingesta dietética total (U.S.

Food and Drug Administration, 2009). Un nutraceutico se diferencia de un suplemento nutricional ya que no solamente debe suplementar la dieta sino también ayudar en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o desorden de la salud y además, puede usarse como un alimento convencional o como el único plato en una comida o dieta. Así, un alimento puede ser un alimento funcional para una persona y un nutraceutico para otra (Kalra, 2003).

De acuerdo a lo anterior, bajo el término “nutraceutico” puede agruparse un alimento, parte de un alimento, o un compuesto de origen natural que puede encontrarse en una matriz no alimenticia en una concentración mayor a la presente en un alimento natural. Puede considerarse como nutraceutico, la fibra dietética, los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente los omega-3, aminoácidos, y vitaminas antioxidantes, por ejemplo. (Barros *et al*, 2008)

En Canadá, un producto nutraceutico se ha definido como un producto aislado o purificado a partir de un alimento que generalmente se vende en una forma farmacéutica (por ejemplo, pastilla, cápsula, polvo) (Barnard, 2008). Un nutraceutico ha demostrado poseer un beneficio fisiológico o proveer protección contra una enfermedad crónica (Food Directorate of Health Canada, 2002)

Adams (2003) hace una diferenciación en los componentes de los alimentos, dividiéndolos en nutrientes, como carbohidratos, grasas, proteínas, minerales y vitaminas, que son fuentes de energía y materia prima para la construcción de tejidos; y los componentes que denomina “*nutricinas*”, que son aquellos componentes de los alimentos que ejercen un efecto benéfico en la salud, más que contribuir directamente a la nutrición, que tienen diferentes efectos en el metabolismo del cuerpo: protegen contra la oxidación, los microorganismos, apoyan a la digestión, absorción e inmunomodulación, por lo que mantienen la salud y evitan enfermedades. Dentro de estos compuestos están los oligosacáridos, enzimas, emulsificantes, antioxidantes, antimicrobianos, y componentes que contribuyen al sabor y color de los alimentos. Sin embargo, distingue entre *nutricinas*, nutraceuticos (moléculas que son capaces de controlar o curar enfermedades) y alimentos funcionales (alimentos que tienen un efecto benéfico en la salud), indicando que estos dos últimos deben su actividad a las *nutricinas*. Al existir una ingesta adecuada de nutrientes y *nutricinas*, se tendrá un crecimiento y mantenimiento orgánico adecuado

y se evitará la enfermedad, manteniendo la salud sin necesidad de recurrir a tratamientos médicos con excepción del caso de enfermedades infecciosas.

La economía actual, con el fenómeno de globalización, hace necesaria la regulación de los productos, sobre todo de los alimentos funcionales y nutracéuticos, para que exista un consenso respecto a las definiciones o los aspectos definatorios de estas dos categorías. Sin embargo, las regulaciones de cada país todavía no han sido homologadas. Stephen (1998) aborda este tema, indicando lo siguiente: en el Reino Unido, un alimento que tiene incorporado un componente para dar un beneficio médico o fisiológico específico, distinto al meramente nutricional, es un *alimento funcional*. En Japón, se ha definido a los alimentos para un uso específico en la salud (Foods for Specific Health use FOSHU) como aquellos que:

- Están diseñados para su consumo como parte de una dieta regular. (Chadwick 2003)
- Se espera posean un efecto específico en la salud debido a constituyentes relevantes del alimento.
- Son alimentos a los cuales se les ha eliminado los compuestos alergenos y el efecto de estas eliminaciones (o adiciones) ha sido evaluado científicamente y ha sido otorgado permiso para atribuirles efectos benéficos específicos en la salud que pueden esperarse por su consumo.
- No deben presentar riesgo a la salud o higiene (Stephen, 1998).

En Europa, un alimento se considera funcional si ha demostrado de manera satisfactoria que afecta positivamente una o más funciones en el cuerpo, más allá de efectos nutricionales adecuados, de manera relevante para ejercer un mejor estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedades. Debe permanecer como alimento y demostrar su efecto en cantidades que se espera sean consumidas de manera normal en la dieta. No son píldoras ni cápsulas, sino parte de un patrón normal de alimento. Puede ser un alimento natural o uno al cual se ha añadido, removido o modificado un componente o modificado la biodisponibilidad de un componente o cualquier combinación de estas posibilidades (Chadwick, 2003).

Los polifenoles son compuestos que se consideran nutracéuticos importantes, debido a su actividad biológica. El término incluye un grupo complejo de sustancias que tienen en común un anillo aromático al cual están unidos uno o más grupos hidroxilo y en este grupo se encuentran

ácidos fenólicos y sus derivados, flavonas, flavonoides y antocianinas, entre otros. Este gran grupo de compuestos es el responsable de la actividad antioxidante de frutas, vegetales y hongos (Álvarez Parrilla y colaboradores, 2007).

La vitamina C es importante, ya que los seres humanos no son capaces de sintetizar ácido L-ascórbico debido a que se carece de la enzima L-gulonolactona oxidasa, y además de su importancia en la prevención del escorbuto, el ácido L-ascórbico tiene un papel muy importante en otros aspectos biológicos, por lo que se investiga más detenidamente su papel en la prevención de enfermedades como arterioesclerosis y enfermedad coronaria (Lee, 1994). Además está bien documentado el efecto antioxidante de la vitamina C y otras vitaminas como línea de defensa contra la oxidación *in Vitro* de fracciones de lipoproteína de baja densidad (Lachance, 1994)

### **5.7 Nutracéuticos en hongos**

Algunas de las sustancias que se han encontrado en hongos y que se reportan con valor medicinal o terapéutico incluyen polisacáridos  $\beta$ -glucanos, derivados de ácidos nucleicos, lípidos, péptidos y proteínas. (Greene, 1990). También debe recordarse que muchos de los hongos no presentan la celulosa como el componente que da rigidez a la pared celular, sino la quitina, un polímero de aminoazúcares, además de otros polisacáridos como mananos, galactanos o quitosan. (Madigan, Martinko y Parker, 2004)

En un estudio realizado en muestras de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ferulae* y *Clitocybe maxima*, se encontró que el contenido de azúcares solubles varió entre 1.76 y 8.89 mg/g y el contenido de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico dio valores entre 5.10 y 11.1 mg/g (Tsai, 2009)

Un estudio sobre *Agrocybe aegerita*, en el cual se logró aislar y caracterizar parcialmente una lectina novedosa, indica que tal lectina mostró actividad contra varias clases de líneas celulares tumorales y que inhibió significativamente el crecimiento de células S-180 *in vivo*. El mecanismo de actividad antitumoral de las lectinas puede provenir de su actividad



inmunomoduladora, pero los autores del estudio proponen mecanismos de inducción de apoptosis y actividad DNAsa, con base en los resultados de este trabajo (Zhao y colaboradores, 2003).

En 2005, se publican los resultados de un estudio en el que se examinó la actividad antigenotóxica del polvo seco de tres especies diferentes de hongos: *Agrocybe cylindracea*, *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*. De ellos, *A. cylindracea* mostró el mejor efecto supresor de genotoxicidad, siendo efectivo con cada uno de los compuestos carcinógenos ensayados, 4-Nitroquinolina-N-óxido, dimetilbenzo[a]antraceno, N-nitrosodimetilamina y aflatoxina B<sub>1</sub>. Los datos de los experimentos sugieren que el compuesto responsable de la actividad es una proteína o un péptido, que se destruye por temperatura, por lo que al cocinar el hongo se estaría perdiendo este compuesto, pero en polvo seco del hongo, la integridad del compuesto se mantiene (Taira y colaboradores, 2005).

Al estudiar el contenido nutricional y la actividad antioxidante de hongos silvestres del Estado de Chihuahua, al norte de México, se encontró que los hongos silvestres estudiados pueden ser una fuente importante de alimento, con un elevado contenido de polifenoles y actividad antioxidante evaluada por el ensayo de reducción férrica FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Álvarez-Parrilla y colaboradores, 2007)

Un estudio sobre los beneficios sobre la salud que tiene el consumo del *Agrocybe cylindracea* (Diyabalanage et al, 2008) sugiere que el consumo del hongo ayudará a aliviar condiciones inflamatorias, así como a reducir el desarrollo de cáncer de estómago y mama, ya que se encontró que contiene una ceramida, metil β-glucopiranosido, ácido linoleico y metil linolenato. La ceramida resultó tener acción de inhibición sobre COX 1 y 2, a una IC<sub>50</sub> 5.3 ug/mL.

Una investigación sobre la acción antioxidante e inhibidora de la ciclooxigenasa por compuestos aislados de los cuerpos fructíferos de *Agrocybe cylindracea* concluye que la actividad antioxidante e inhibitoria de COX mostrada por los compuestos aislados del hongo, sugiere que el consumo del mismo diariamente puede tener un beneficio potencial para la salud (Zhang y colaboradores, 2003)

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Evaluar la composición de nutrientes y nutraceuticos en *Agrocybe cylindracea* colectado de poblaciones silvestres de Guatemala.

### **6.2 Objetivos Específicos**

Determinar la composición porcentual de proteínas, grasas, carbohidratos y minerales en los cuerpos fructíferos de *Agrocybe cylindracea*.

Determinar y cuantificar la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y vitamina C en cuerpos fructíferos de *Agrocybe cylindracea*.

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *Agrocybe cylindracea*

## **7. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El *Agrocybe cylindracea* puede catalogarse como alimento nutraceutico con base en su composición química.

## **8. METODOLOGÍA**

### **8.1 Universo y población**

El universo del estudio lo constituyó el hongo *Agrocybe cylindraceae*, la población, los hongos que crecen en Guatemala y la muestra, los hongos silvestres obtenidos según se indica a continuación.

### **8.2 Obtención de la muestra**

Se colectó ejemplares de *Agrocybe cylindracea* de poblaciones silvestres del departamento de San Marcos: Aldea Santa Irene, San Antonio Sacatepéquez, localizada a 2,740 msnm, 14° 57' 26" de latitud y 91° 42' 37" de longitud; Cantón Tojchiná, San Antonio Sacatepéquez, localizado a 2,470 msnm, 14° 58' 02" de latitud y 91° 43' 44" de longitud; Caserío Monterrey, Aldea Santa Teresa, San Pedro Sacatepéquez, localizado a 2,740 msnm, 14° 59' 30" de latitud y 91° 43' 57" de longitud; Aldea Santa Rita, San Antonio Sacatepéquez, localizada a 2,310 msnm, 15° 58' 03" de latitud y 91° 44' 42" de longitud, los días 26 y 27 de mayo de 2009.

Los ejemplares recolectados se identificaron con ayuda del licenciado Osberth Morales y Roberto Cáceres, del Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, y se depositaron ejemplares en la Micoteca de Macrohongos de Guatemala "Lic. Rubén Mayorga Peralta", de dicho Departamento.

#### **8.2.1 Tratamiento y conservación de los ejemplares**

Los hongos se desecaron dentro de las 24 horas después de recolectados, usando una desecadora de alimentos, pesando los ejemplares antes y después del proceso de desecado para calcular así el porcentaje de humedad. Posteriormente se molieron en una licuadora doméstica y el polvo resultante se guardó en frascos de vidrio, protegido de la luz solar, para su análisis posterior.

### **8.2.2 Preparación de la muestra objeto de estudio**

Se preparó una mezcla compuesta, mezclando la totalidad de los hongos recolectados en cada uno de los diferentes lugares del departamento de San Marcos, Guatemala, sin importar su estado de madurez y sin separar el píleo del estípite, debido a que la cantidad de hongos silvestres recolectados resultó limitada.

### **8.3 Repeticiones y diseño estadístico**

Cada muestra compuesta se analizó para cada uno de los compuestos a determinar, y los análisis se hicieron en cuadruplicado, con excepción del análisis proximal, debido a la limitación en la cantidad de muestra. Se calculó la media de las repeticiones y desviación estándar. Los resultados se reportaron como el promedio de los valores obtenidos.

### **8.4 Materiales**

Bolsas de polipapel y navaja

Libreta de campo

Deshidratadora de alimentos

Balanza electrónica de 200.00 g de capacidad, Ohaus

Frascos de vidrio con tapón de rosca

Etiquetas para identificación

Licadora eléctrica con vaso de vidrio, Osterizer

Agitador magnético y magneto

Baño de ultrasonido

Balanza analítica, Sartorius

Espectrómetro FRX-RT

Centrífuga

Espectrofotómetro ultravioleta visible, Varian

Cristalería de uso común en el laboratorio

Reactivos según lo descrito en la metodología específica para cada prueba

## **8.5 Métodos**

### **8.5.1. Análisis proximal**

#### **8.5.1.1 Contenido de humedad de los hongos frescos:**

Los hongos se pesaron y luego se colocaron en una desecadora de alimentos por un mínimo de 24 horas a 60 °C. La pérdida de peso corresponde a la humedad.

#### **8.5.1.2 Determinación de humedad en el polvo de hongos desecados:**

Se determinó gravimétricamente por calentamiento en un horno de tiro a 105°C, hasta obtención de peso constante.

#### **8.5.1.3 Determinación de cenizas totales:**

Se usó el método gravimétrico por incineración a 850 °C, en una mufla por 4 horas.

#### **8.5.1.4 Determinación de proteína:**

Se efectuó la determinación de nitrógeno por el método de Kjeldhal, y luego se calculó el porcentaje de proteína multiplicando el valor de nitrógeno por el factor 4.38.

#### **8.5.1.5 Determinación de grasa cruda:**

Se usó la metodología establecida por AOAC (1995): método gravimétrico de extracción exhaustiva con hexano en un aparato Soxhlet. Una vez extraída la grasa, se evaporó el disolvente y se pesó el residuo obtenido, que corresponde a triglicéridos y lípidos no saponificables.

#### **8.5.1.6 Determinación de fibra cruda:**

Se determinó por digestión primero en ácido y luego en base, secado y calcinación del residuo obtenido.

#### **8.5.1.7 Determinación de carbohidratos totales:**

Se calculó por diferencia, a partir de los datos de contenido de proteína, grasas, fibra y cenizas.

#### **8.5.1.8 Determinación del contenido energético:**

Se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Energía (kcal/100g)} = (2.62 \times \% \text{ proteína}) + (8.37 \times \% \text{ grasa}) + (4.2 \times \% \text{ carbohidratos})$$

#### **8.5.2. Nutracéuticos**

##### **8.5.2.2 Fenoles totales:**

Se determinó colorimétricamente por el método Folin-Ciocalteu (Ver Anexo 5), expresando los resultados como mg ácido gálico/g muestra.

##### **8.5.2.3 Flavonoides totales:**

Se determinó colorimétricamente por reacción con  $\text{AlCl}_3$  (Ver Anexo 6), expresando los resultados como mg rutina/g extracto.

##### **8.5.2.5 Vitamina C:**

Se determinó volumétricamente utilizando N-bromosuccinimida como reactivo valorante (Ver Anexo 2).

##### **8.5.2.6 Minerales:**

Se determinaron por medio de la técnica de Reflexión de Rayos X, según metodología del Departamento de Físicoquímica de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia (Ver Anexo 3).

#### **8.5.3 Actividad antimicrobiana**

Se utilizó la metodología estándar de Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia para determinar la actividad frente a bacterias gram (+) gram (-). PEO No.4 (Ver Anexo 7). Para ello se utilizó un extracto acuoso fresco, obtenido del polvo de hongos por maceración con agua dentro de un baño de ultrasonido por 30 minutos a temperatura ambiente, a modo de obtener una concentración de 10 mg muestra/mL extracto.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Humedad

Porcentaje de humedad de la muestra fresca:  $90.08\% \pm 2.8$

### 9.2 Análisis proximal

Como gramos/100 gramos de muestra seca:

Grasa	1.24
Proteína	19.23
Cenizas	10.97
Fibra cruda	14.57
Carbohidratos	41.29
Energía	234.18 kcal/100 g muestra seca

### 9.3 Fenoles totales

Como miligramos de ácido gálico/g muestra seca:  $5.69 \pm 1.02$  mg/g

### 9.4 Flavonoides totales

Como microgramos de rutina/g muestra seca:  $3.56 \pm 2.09$  ug/g

### 9.5 Vitamina C

Como miligramos de ácido ascórbico/g muestra seca:  $1.52 \pm 0.16$  mg/g

### 9.6 Minerales

Como miligramos de mineral/g muestra seca

Potasio	$7.21 \pm 1.67$
Hierro	$0.53 \pm 0.06$
Cobre	$0.01 \pm 0.01$
Zinc	$0.12 \pm 0.04$

### 9.7 Actividad antimicrobiana

Se ensayó únicamente actividad contra bacterias y una levadura. Todos los resultados fueron negativos para los siguientes microorganismos ensayados: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* y la levadura fue *Candida albicans*.

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del análisis proximal muestran variaciones al compararlo con los resultados obtenidos para la misma especie en otras investigaciones, como los reportados por Mau y Tseng en 1998, tal como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

Comparación de la composición química de *Agrocybe cylindracea* recolectado en el departamento de San Marcos (SM), Guatemala, con cepas del hongo obtenidas en China.

	<b>Humedad</b> %	<b>Proteína</b> %	<b>Grasa</b> <b>Cruda %</b>	<b>Cenizas</b> %	<b>Carbohi-</b> <b>dratos</b> <b>totales %</b>
<i>Agrocybe cylindracea</i> SM	90.56	19.23	1.24	10.97	41.29
<i>Agrocybe cylindracea cepa B*</i>	90.35	44.24	2.18	8.19	29.02
<i>Agrocybe cylindracea cepa M*</i>	90.34	34.17	2.48	7.66	39.54
<i>Agrocybe cylindracea cepa W*</i>	91.50	44.94	2.71	8.59	27.06

\*Mau y Tseng, 1998

La muestra de la especie recolectada en Guatemala contiene menos proteína y grasa cruda, y mayor contenido de cenizas y carbohidratos totales que las muestras de la especie china. Tsai y colaboradores (2008) encontraron que el análisis proximal de muestras de *A. cylindracea* analizadas por ellos, dieron como resultado 16.47% de proteínas, 56.71 % de carbohidratos totales, valores cercanos a los obtenidos para la muestra guatemalteca; los valores de cenizas totales, 6.65% son menores que los reportados para la muestra guatemalteca y las muestras de Mau y Tseng (1998); la fibra cruda, 19.54%, y grasa cruda, 3.63%, fue mayor que para la muestra guatemalteca. Las diferencias en los resultados del análisis proximal pueden deberse a factores ambientales, que determinen la composición del hongo, o bien a diferencias en las metodologías analíticas, como lo menciona Boa (2004), sin embargo los valores reportados para la composición del hongo están entre los valores reportados para otros hongos silvestres, como los reportados por en un estudio sobre hongos silvestres recolectados en Turquía (Colak, Faiz y Sesli, 2009), que



mostraron los siguientes rangos, aunque es de hacer notar que el factor que utilizaron estos investigadores para el cálculo de proteína fue mayor (6.25) lo que afecta el cálculo de porcentaje de proteína y de carbohidratos totales para las muestras:

**Tabla II.**

Composición química de hongos silvestres según lo reportado por Colak, Faiz y Sesli (2009) y los valores obtenidos para *A. cylindracea* recolectado en San Marcos, Guatemala (SM)

	Humedad %	Proteína %	Grasa Cruda %	Cenizas %	Carbohidratos Totales %
Rango de Valores	84.82 – 93.31	21.12 – 50.10	1.40 – 10.58	2.00 – 11.38	34 – 70
<i>Agrocybe cylindracea</i> (SM)	90.56	19.23	1.24	10.97	41.29

De acuerdo a la Tabla II, el contenido de proteína encontrado en la muestra de *A. cylindracea* es menor que el límite inferior encontrado en los hongos recolectados en Turquía, pero esto se justifica considerando el factor diferente utilizado para el cálculo; sin embargo, el análisis proximal de hongos recolectados en Azad Kashmir, Paquistán (Sabir, S y colaboradores, 2003) reporta, en promedio, 1.32% de grasa cruda, y 21.91% de proteínas, valores bastante parecidos a los encontrados aquí para *A. cylindracea*. Los valores de humedad, cenizas y carbohidratos totales, están entre los valores reportados en el estudio sobre hongos recolectados en Turquía. Sin embargo ya que, aunque se tenía una muestra compuesta, se realizó un único análisis proximal completo, los resultados obtenidos no son concluyentes sobre el contenido nutricional del hongo en estudio y deberá analizarse otras muestras para obtener valores promedio del análisis proximal.

Los valores obtenidos indican que *Agrocybe cylindracea* es un alimento de bajo contenido en grasa. La calidad de la proteína del hongo dependerá del porcentaje de aminoácidos esenciales que contenga. Mau y Tseng (1998) reportan el contenido de aminoácidos libres presentes en tres cepas diferentes de *Agrocybe cylindracea*, siendo los más abundantes el ácido glutámico, treonina, arginina, fenilalanina y ácido aspártico, datos que podrán servir de referencia para futuras investigaciones.

Las células de los hongos son ricas en polisacáridos como la quitina, los  $\beta$ -glucanos y los mananos, compuestos importantes en la fibra dietética de los alimentos. La fibra cruda normalmente subestima el valor total de la fibra dietética, porque los componentes solubles de la fibra no se miden en la fibra cruda, por cuestiones de metodología. Los  $\beta$ -glucanos obtenidos de macrohongos constituyen un grupo de compuestos que recientemente ha demostrado poseer actividades biológicas de interés (Lindequist, Niedermeyer y Jülich, 2005), por lo que es importante analizar las fracciones solubles de la fibra dietética de los hongos.

El contenido de fenoles totales se evaluó para determinar el valor nutracéutico de *Agrocybe cylindracea*, ya que a estos compuestos se le atribuyen varios efectos beneficiosos para la salud, atribuidos a su capacidad antioxidante causada por su capacidad para quelar metales, inhibir lipooxigenasa y secuestrar radicales libres (Puttarajo y colaboradores, 2006; Kim y colaboradores, 2008). Nutricionalmente, la actividad antioxidante de los alimentos se asocia con un efecto protector contra el envejecimiento y contra ciertas enfermedades, como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Martínez Flores y colaboradores, 2002), por lo que el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los alimentos o extractos vegetales es estudiada ampliamente, aunque no todos los compuestos fenólicos están asociados a efectos benéficos, por ejemplo, los taninos se consideran antinutrientes, porque ejercen efectos negativos sobre la nutrición, como se ha demostrado en investigaciones con animales (Martínez Valverde y colaboradores, 2000). El contenido de fenoles totales encontrado (5.69 mg/g ) está en el mismo rango que el reportado por Tsai para *Pleurotus*, (5.10-11.1 mg/g), además el valor obtenido está en el rango de moderado contenido de fenoles totales para los hongos saprobios comestibles de la India, analizados por Puttarajo y colaboradores (2006); su contenido es similar al de los hongos estudiados por Kim y colaboradores (2008), lo que indica que este hongo puede tener actividad antioxidante, ya que existe una correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante (Álvarez Parrilla y colaboradores, 2007).

El método de Folin-Ciocalteu es un método general para la determinación de compuestos fenólicos, basado en la reducción del reactivo para formar un compuesto coloreado, pero otros compuestos reductores son capaces de provocar la misma reacción que los compuestos fenólicos, como el ácido ascórbico, algunos azúcares y aminoácidos, por ejemplo, por lo que el método

puede resultar en una sobreestimación del contenido de polifenoles en el material investigado (Barros y colaboradores, 2009).

Dentro del grupo de compuestos fenólicos se incluye a los flavonoides, siendo tal vez el grupo más importante de compuestos fenólicos, y el contenido de éstos es muy bajo. Esto es consistente con lo reportado por Iwashina (2000), quien indica que solamente las plantas poseen la capacidad biosintética para producir flavonoides, mientras que animales y hongos no, aunque menciona dos hongos, *Aspergillus candidus* Link, y *Phallus impudicus*, que sí están reportados como productores de flavonoides. Considerando que la metodología utilizada en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT, para esta determinación evalúa el contenido de flavonoides mediante la reacción de tricloruro de aluminio con rutina y se toma la lectura a 394 nm, mientras que si se utiliza como estándar catequina (Marinova y colaboradores, 2005) la absorbancia se lee a 510 nm, está claro que utilizar diferentes estándares producirá diferentes resultados en la medición de flavonoides, por lo que debe tenerse cuidado cuando se comparan resultados de diferentes investigaciones. En el trabajo de Kim y colaboradores (2008), se cuantificaron e identificaron fenoles totales y flavonoides totales utilizando HPLC en vez de espectrofotometría, y al comparar los contenidos de flavonoides con el de fenoles totales, se puede observar que aunque el contenido de fenoles totales era muy elevado en algunos hongos, el de flavonoides no y, más importante aún, no se encontró rutina en ninguno de las diez especies de hongos evaluados y catequina, solamente en tres, aunque mencionan que se ha reportado rutina en *Cantharellus cibarius* en una concentración de 2 ug/g. Este mismo trabajo encontró que el contenido de compuestos fenólicos varía grandemente entre especies, por ejemplo, el *Pleurotus ostreatus* contiene ácido gálico, ácido homogentísico, ácido protocatéquico, ácido clorogénico, naringina y mircetina; el *Agaricus bisporus* contiene ácido gálico, pirogalol, ácido 5-sulfosalicílico, naringina y mircetina, y el *Pleurotus eringii* solamente contiene ácido gálico, ácido protocatéquico y naringina (Kim y colaboradores, 2008).

El contenido de vitamina C encontrado en la muestra, 152 mg/100 g muestra seca, fue similar al reportado para *Pleurotus*, que varió de 92 a 144 mg/100 g muestra seca (Bano y Rajarathnam, 1986). En una investigación sobre las propiedades antioxidantes de tres hongos silvestres recolectados en Portugal, *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* y *Agaricus*

*arvensis*, se encontró que el contenido de vitamina C estuvo en un rango de 13 a 35 mg/100 g (Barros y colaboradores, 2007). En un estudio sobre el contenido de vitaminas en 3 hongos silvestres recolectados en la región del Mar Negro en Turquía, se encontró que el contenido de vitamina C en *Boletus edulis* fue de 2.64 mg/100 g muestra seca, en *Cantharellus cibarius* fue de 4.97 mg/100 g y en *Lactarius piperatus*, 2.83 mg/100g (Caglarmak, Unal, Otles, 2002); *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae* y *Coriolus vesicolor* no presentaron ácido ascórbico (Mau y colaboradores, 2002), por lo que al compararlos con estas especies, el contenido de vitamina C para el *Agrocybe cylindracea* resulta ser mayor, aunque debe tomarse en cuenta las diferentes metodologías utilizadas en la cuantificación. El contenido de vitamina C encontrado en tres especies de hongos cultivados, *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus*, varió entre 17 y 25 mg/100 g hongo seco, según Mattila y colaboradores (2001), lo que parece indicar que el contenido de vitamina C en los hongos puede ser muy variable. La vitamina C tiene efectos antioxidantes beneficiosos, y su contenido en los hongos es variable, incluso dentro de las especies (Caglarmak, Unal, Otles, 2002). En la base de datos sobre contenido de nutrientes en los alimentos presentada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA National Nutrition Database for Standard Reference, 2009), se indica que el *Agaricus bisporus* fresco contiene 2.1 mg vitamina C/100 g hongo, para el shiitake, *Lentinus edodes*, 3,5 mg de vitamina C/100 g de hongo seco, pero no reporta valores de esta vitamina para *Cantharellus cibarius*, *Flammulina veluptes*, *Pleurotus ostreatus*.

Los hongos van a presentar un contenido mineral variable, porque dependerá del contenido de éstos en el entorno donde crecen. Si se compara el contenido mineral encontrado para la muestra de *Agrocybe cylindracea* con lo reportado para otras especies (Caglarmak, Unal, Ótles, 2002), podemos observar que se sigue la tendencia observada para los hongos, es decir, el potasio es relativamente abundante y presentan pequeñas cantidades de elementos importantes, como hierro, cobre y zinc.

**Tabla III**

Contenido de minerales en algunas especies de macrohongos (Resultados expresados en ppm.)

	K	Fe	Cu	Zn
<i>Cantharellus cibarius</i> *	5289.45	10.47	9.20	41.72
<i>L piperatus</i> *	2749.30	33.83	3.79	5.72
<i>Boletus edulis</i> *	2032.54	7.86	7.86	41.72

Caglarmak, N., Unal K., Ötles S. 2002

Sin embargo, la metodología empleada no permitió la determinación de magnesio en las muestras, y este elemento se reporta como el tercero en abundancia en los hongos, luego del fósforo y el potasio (Mattila y colaboradores, 2001). Además, la variación en el contenido de cobre es muy alta, por lo que su determinación por una metodología distinta sería recomendable.

La falta de actividad antimicrobiana del extracto acuoso del hongo indica que en las fracciones solubles en agua no se encuentran compuestos que presenten esta propiedad, aunque para otra especie, *Agrocybe molesta*, si se ha reportado actividad antibacterial y antifúngica (Poucheret y colaboradores, 2006). Esto es consistente con lo reportado por Ngai y colaboradores (2005), quienes encontraron el péptido agrocybin en *A. cylindracea*, con propiedades antifúngicas pero no antibacterianas.

## 11. CONCLUSIONES

El análisis proximal de *Agrocybe cylindracea* indica que el hongo seco contiene 1.45 grasa cruda, 19.23 % proteína, 10.97 % ceniza, 14.57% fibra cruda, 41.29% carbohidratos totales y un contenido energético de 234.18 kcal/100 g hongo seco.

El análisis proximal de *Agrocybe cylindracea* mostró variaciones en los contenidos porcentuales de nutrientes, al compararlo con los resultados obtenidos por otros investigadores para hongos de la misma especie obtenidos en China.

El análisis proximal de *Agrocybe cylindracea* indica que es un alimento bajo en grasas y bajo en calorías, rico en proteínas y carbohidratos totales, por lo que es una buena opción alimenticia para aquellas personas que no puedan o deseen consumir proteínas de origen animal, sin embargo, por no contar con un perfil de aminoácidos, no es posible saber si el contenido de aminoácidos esenciales es similar a la carne.

El contenido de polifenoles y de ácido ascórbico (vitamina C) indica que el *Agrocybe cylindracea* puede considerarse un alimento funcional, ya que tanto los polifenoles como el ácido ascórbico son compuestos con actividad antioxidante relacionada con efectos beneficiosos sobre la salud.

El contenido de minerales está dentro de los rangos reportados para otros macrohongos.

El extracto acuoso del hongo no mostró ninguna actividad antimicrobiana contra los microorganismos ensayados.

## 12. RECOMENDACIONES

Determinar el perfil de ácidos grasos encontrados en la grasa presente en *Agrocybe cylindracea*, para determinar cuales ácidos grasos son los más abundantes.

Determinar el perfil de aminoácidos presentes en el *Agrocybe cylindracea*, para evaluar la calidad de las proteínas presentes en el hongo.

Determinar el contenido de fibra dietética y azúcares solubles en el *Agrocybe cylindracea*.

Realizar más análisis sobre la composición mineral del hongo, ya que la metodología empleada en esta investigación, no permitió la determinación del contenido de magnesio en la muestra analizada.

Evaluar la actividad antioxidante de extractos de *Agrocybe cylindracea* y correlacionarla con el contenido de polifenoles totales encontrados en el hongo.

Determinar cuales son los polifenoles más abundantes en *Agrocybe cylindracea*.

Determinar el contenido de polifenoles y vitamina C en el micelio de *Agrocybe cylindracea* cultivado en medio líquido a partir de cepas silvestres, y comparar los resultados con lo hallado en los cuerpos fructíferos del hongo colectado de poblaciones silvestres.

Efectuar análisis proximal y las determinaciones de polifenoles y vitamina C en cuerpos fructíferos de *Agrocybe cylindracea* cultivado, y comparar con los resultados obtenidos para los hongos silvestres.

### 13. REFERENCIAS

- Adams, C. 2003. Nutricines: Food components in health and nutrition. Nottingham. Nottingham, United Kingdom UK. 128 p.
- Aldana Martínez, A. 2000. Comparación de la eficiencia de producción del inóculo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa ECS 0110 en cinco granos. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. GT.
- Álvarez Parrilla, E. *et al.* 2007. Total phenols and antioxidant activity of comercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. *Cienc. y Tecnol. Aliment.* 5(5):329-334.
- Andrade Martínez, C. 2007. Descripción de las características macroscópicas, de cultivo *in Vitro* y producción de inóculo en paja y granos de trigo de *Agrocybe aegerita* (Brigant) Singer. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala GT.
- Arrabal, J. Micología.net. Consultada el 7 de julio de 2009. Disponible en <http://www.micologia.net/micologia/partes.htm>
- Barnard, D. 2008. Functional Foods and Nutraceuticals Cluster. Presentación en power point. Consultada el 6 de julio 2009. Disponible en <http://www.ficci-hes2008.com/presentation/Day%20I-%2025th/ParallelSessionIa/davidBarnard.pdf>
- Bailey, W. 1958. The Reaction of Pentoses with Anthrone. Vol 68:669-672. Consultada el 6 de Julio 2009. Disponible en <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1200415&blobtype=pdf>
- Bano, Z., Rajarathnam, S. 1986. Vitamine values of *Pleurotus* mushrooms. *Planto Food for Human Nutrition.* 36(1):11-15. Disponible en <http://www.springerlink.com/content/u4375715767j4q64/>
- Barros, L *et al.* 2007. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry.* 103:413-419
- Barros, L *et al.* 2008. Wild and commercial mushrooms as a source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem Toxicol.* 46:2742-2747.
- Barros, L *et al.* 2009. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem Toxicol.* 47:1076-1079
- Boa, E. 2004. Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. *Non Word Forest Products* No. 17. FAO. Roma. IT. Disponible en línea en <http://www.fao.org/docrep/007/y5489e/y5489e00.htm>



- Bran, MC *et al.* 2003. Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Revista Científica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1(1):5-24.
- Bran, MC *et al.* 2004. Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula (Fase IV). Guatemala, GT. Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI). Informe de Avance 2004. 60 p
- Çaglar, N., Unal K., Ötles S. 2002. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Black Sea region of Turkey. *Micología Aplicada Internacional* 14(1):1-5
- Castillo Gutiérrez, FA. 1989. Composición y valor nutritivo de la proteína de *Pleurotus spp* cultivado sobre pulpa de café. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. GT.
- Chadwick, R. *et al.* 2003. *Functional Foods*. Springer. Berlin, Germany. D. 218 p
- Colak, A; Faiz, Ö; Sesli, E. 2009. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turk J Biochem.* 34(1): 25-31
- Diyabalange, T *et al.* 2008. Health beneficial qualities of the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Food Chemistry.* 108(1):97-102
- Food Directorate of Health Canada. Bureau of Nutritional Sciences. Policy Paper- Nutraceuticals/Functional Foods and health claims on foods. 2002. Consultada el 6 de Julio de 2009. Disponible en [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/nutra-funct\\_foods-nutra-fonct\\_aliment-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/nutra-funct_foods-nutra-fonct_aliment-eng.php).
- Gómez Pompa A. 2003. *The Lowland Maya Area*. New York, USA. Haworth Press. 659 pp.
- Greene WM. 1990. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *Journal of Food Production.* 53(10):883-894.
- Guzmán G. 2003. *Los hongos del Edén, Quintana Roo; Introducción a la Microbiota Tropical de México*. México. MX. Instituto de Ecología. 316 p.
- Index Fungorum. CABI Databases. Consultada el 23 de junio 2009. Disponible en <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- Iwashina, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J Plant Res.* 113(3):287-299
- Johnson E. 1988. Determination of the Effect of Various Modes of Cooking on the Vitamin C Content of a Common Food, Green Pepper. *J. Chem. Educ.* 65(10) 926-927.

- Kalra E. 2003. Nutraceutical-Definition and introduction. *AAPS Pharm Sci.* 5(3):Article 25. Consultada el 15 de mayo 2009. Disponible en <http://www.aapsj.org/view.asp?art=ps050325>
- Kim, M. *et al.* 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J. Agric. Food Chem.* 56: 7265-7270
- Lachance, P. 1994. Micronutrients in cancer prevention. En *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I.* ACS Symposium Series. American Chemical Society, WA. EE.UU. 49-64
- Lakhanpal TN; Rana M. 2005. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources.* 3(2):288-303.
- Lee, E. 1994. Synthesis of L-ascorbic acid and its 2-phosphate and 2-sulfate esters and its role in the browning of orange juice concentrate. En *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I.* ACS Symposium Series. American Chemical Society, WA. EE.UU. 389-411
- Lindequist, U., Niedermeyer T., Jülich W-D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM.* 2(3):285-299.
- Loewus FA. 1952. Improvement in Anthrone Method of Determination of Carbohydrates. *Anal Chem.* 24(1):219. Consultada el 10 de Julio 2009. Disponible en <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60061a050>
- Lowry B. 1971. New records of mushroom stones from Guatemala. *Micologia.* 63:983.
- Makkar H. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage: A laboratory manual. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 102 pp
- Madigan, M; Martinko J; Parker, J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. 10a. edición. Pearson-Prentice Hall. Madrid, España ES. 1096 p.
- Manzi P; Aguzzi A; Pizzoferrato L. 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry.* 73(3):321-325.
- Marinova D; Ribarova F; Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy.* 40(3):255-260.
- Martínez Flores, S. *et al.* 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII(6):271-278.
- Martínez Valverde, I. *et al.* 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Archivos latinoamericanos de Nutrición.* 50(1):5-18.

- Mattila, P. *et al.* 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 49:2343-2348
- Mau, J., Tseng, Y. 1998. Nonvolatile taste components of three strains of *Agrocybe cylindracea*. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2071-2074.
- Mau, J., Lin H., Chen C. 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6072-6077.
- Ngai, P. *et al.* 2005. Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides.* 26(2):191-196
- Pérez Estrada, Rita Coralia. 1990. Caracterización química del valor nutritivo de los anacates (*Cantharellus cibarius Fr.*). Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. GT. 58 pp
- Poucheret, P. Fons, F., Rapior, S. 2006. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20 year retrospective analysis. *Cryptogamie, Micologie.* 27(4):311-333
- Puttarajo, N. *et al.* 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 54:9764-9772.
- Sabir, S. *et al.* 2003. Proximate analysis of mushrooms of Azad Kashmir. *Pakistan Journal of Plant Pathology.* 2(2); 97-101.
- Sommerkamp I. 1984. Hongos comestibles en los mercados de Guatemala. Guatemala GT. Cuadernos de Investigación DIGI-USAC. 3:90.
- Stamets, P. Mycelium running: how mushrooms can save the world. Consultada el 6 de Julio de 2009. Disponible en [http://books.google.com.gt/books?id=NPI8\\_-omzvsC&pg=PA210&lpg=PA210&dq=agrocybe+aegerita+%2Bsynonyms&source=bl&ots=38oz8\\_boYM&sig=F1V92M3Hhhnjp6wCdKF8TQ81\\_Y8&hl=es&ei=V-jMSu3sNJDYsgPIybmcAQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1#v=onepage&q=agrocybe%20aegerita%20%20synonyms&f=false](http://books.google.com.gt/books?id=NPI8_-omzvsC&pg=PA210&lpg=PA210&dq=agrocybe+aegerita+%2Bsynonyms&source=bl&ots=38oz8_boYM&sig=F1V92M3Hhhnjp6wCdKF8TQ81_Y8&hl=es&ei=V-jMSu3sNJDYsgPIybmcAQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1#v=onepage&q=agrocybe%20aegerita%20%20synonyms&f=false)
- Stephen, A.W. (1998). Regulatory aspects of functional products; en *Functional Foods*. Mazza, G. (Ed). Technomic Publishing Inc. Lancaster, Pennsylvania USA. 460 p
- Taira K *et al.* 2005. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Mutation Research.* 586:115-123.
- Tsai, S-Y. *et al.* 2008. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chemistry* 107:977-986
- Tsai Shu-Yao *et al.* 2009. Flavor components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 113(2):578-584. Consultada el 1 de Julio de 2009.

Disponible en [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6T6R-4T7F5N7-2&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=987707489&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=59056aa7c752d19f4cec1bde71ae474f](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6R-4T7F5N7-2&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=987707489&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=59056aa7c752d19f4cec1bde71ae474f)

- Uhart, M.; Albertó, E. 2007. Morphologic characterization of *Agrocybe cylindracea* (Basidiomycetes, Agaricales) from America, Europe and Asia. *Revista Mexicana de Micología*. 24(2):9-18. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=88302402>
- U. S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. December 1, 1995. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994. Consultada el 6 de Julio 2009. Disponible en <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/dietsupp.html>
- U.S. Department of Agriculture National Nutrition Database for Standard Reference. Disponible en <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- U.S. Department of Health and Human Services. U.S. Food and Drug Administration. Food. Dietary Supplements. Consultada el 6 de Julio 2009. <http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/default.htm>
- U.S. Department of Health and Human Services. U.S. Food and Drug Administration. Food and Nutrition. Consultada el 2 de octubre 2009. [http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/\\_s.7\\_0\\_A/7\\_0\\_1OB?navtype=SU&navid=FOOD\\_NUTRITION](http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/_s.7_0_A/7_0_1OB?navtype=SU&navid=FOOD_NUTRITION)
- Waterhouse A. s.f. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine Department of Viticulture and Enology. University of California, Davis. Consultada el 5 de Julio 2009. Disponible en <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/foolinmicro.htm>
- Watling R. 1992. Observations on the Bolbitaceae-30. Some Brazilian taxa. *Sociedad Argentina de Botánica*. 28 (1-4):77-103.
- Zhang, Y., Mills, G., Nair, M. 2003. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Phytochemistry*. 10:386-390
- Zhao, C. *et al.* 2003. An antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochem J.* 374:321-327.

## 14. ANEXOS

### ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Fotografías de <i>Agrocybe cylindracea</i>	38
ANEXO 2: Metodología para la determinación de vitamina C (ácido L-ascórbico)	40
ANEXO 3: Contenido mineral por TFRX	42
ANEXO 4: Resultados de análisis por TFRX	43
ANEXO 5: Análisis de fenoles por el método Folin Ciocalteau	46
ANEXO 6: Determinación de Flavonóides	48
ANEXO 7: Tamizaje de actividad antimicrobiana	49
ANEXO 8: Resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana.	51

## ANEXO 1

**Fotografía 1: Grupo de hongos creciendo sobre un árbol de sauco**



Fotografía cortesía de Roberto Cáceres Staackmann

**Fotografía 2: Ejemplar de *Agrocybe cylindracea* mostrando el velo**



Fotografía cortesía de Roberto Cáceres Staackmann

**Fotografía 3: Grupo de *Agrocybe cylindracea* recién colectados**



Fotografía cortesía de Roberto Cáceres Staackmann

**Fotografía 4: Diversos ejemplares de *Agrocybe cylindracea* donde se aprecia los diferentes tamaños de los cuerpos fructíferos recolectados.**



Fotografía cortesía de Roberto Cáceres Staackmann

## ANEXO 2

### **Determinación de ácido ascórbico (Vitamina C) por valoración con N-bromosuccinimida (NBS) (Johnson, 1988, con modificaciones)**

#### Reactivos

N-bromosuccinimida (NBS) grado reactivo

Ácido L-ascórbico (AA) grado reactivo

Almidón soluble

Yoduro de potasio grado reactivo

Ácido sulfúrico concentrado grado reactivo

Ácido acético glacial

#### Soluciones

Solución de ácido sulfúrico al 5% v/v: 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, diluidos con 95 mL de agua desmineralizada.

Solución de KI al 4% m/v: pesar 4 g de KI y disolverlos en 96 mL de agua desmineralizada.

Solución de ácido acético al 10% v/v: 10 mL de ácido acético glacial se diluyen con 90 mL de agua desmineralizada.

Indicador de almidón 1% m/v: pesar 1 g de almidón soluble, disolverlo en 99 mL de agua. La solución no debe almacenarse más de un día.

Solución madre de NBS: pesar 0.20g de NBS y disolverlo en agua destilada, aforar a 1.0 L. Esta solución es  $1.1 \times 10^{-3}$  M.

Solución estándar de Ácido ascórbico: pesar 0.5000 g de ácido L-ascórbico, transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 1.0 L, disolver con ácido sulfúrico al 5%. Proteger de la luz. La solución no debe almacenarse más de un día.

#### Estandarización de la solución de NBS

En un matraz Erlenmeyer, coloque 1.0 mL de solución de KI al 4%, 4 mL de ácido acético al 10%, 5.0 mL de indicador de almidón 1%, añada 5.0 mL de la solución estándar de ácido ascórbico y de agua destilada hasta alcanzar un volumen de 50 mL y valore con la solución de NBS hasta la aparición permanente de un color azul característico del complejo yodo-almidón. Calcule la cantidad de ácido ascórbico, en miligramos, que se oxida por 1.0 mL de solución de NBS.

#### Extracción del ácido ascórbico (AA).

Pesar 4.0000 g de muestra, añadir 20 mL de agua destilada, colocar en el baño de ultrasonido por 10 minutos y luego agitar por 30 minutos en un agitador magnético. Filtrar a presión reducida, añadir a un matraz aforado de 50 ml que contiene 5.0 mL de ácido sulfúrico al 5%, repetir la extracción de la materia vegetal con otras 2 porciones de 15 mL de agua destilada, filtrar, añadir al matraz y llevar a volumen.

#### Valoración de la muestra

En un matraz Erlenmeyer, coloque 1.0 mL de solución de KI al 4%, 4 mL de ácido acético al 10%, 5.0 mL de ácido sulfúrico al 5%, 5.0 ml de indicador de almidón 1%, añada 5.0 mL de la



solución de la muestra y agua destilada para un volumen de 50 mL y valore con la solución de NBS hasta la aparición permanente de un color azul característico del complejo yodo-almidón. Realizar por triplicado para cada muestra.

#### Cálculos

Ácido ascórbico en el extracto= (mL NBS)(mg AA/mL NBS)(mL totales de extracto/5.0 mL de extracto)

Ácido ascórbico en la muestra= mg AA en el extracto/gramos de muestra.

### ANEXO 3

#### **Contenido mineral por TFRX. Metodología del Departamento de Físicoquímica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, 2009.**

##### Digestión ácida de material vegetal

- Moler la muestra vegetal seca y pesar aproximadamente 0.2000 g en un vaso de precipitados de 25 ml.
- Adicionar cuidadosamente 5 ml de una mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico concentrados en relación 3:2 respectivamente.
- Tapar con un vidrio de reloj y calentar lentamente en estufa hasta digestión completa de la muestra (tiempo aproximado 30 minutos)
- Adicionar cuidadosamente 5ml de agua desmineralizada y evaporar cuidadosamente los vapores ácidos en la campana de extracción.
- Mantener el volumen constante del vaso de precipitados adicionando agua desmineralizada durante el tiempo de eliminación de los vapores ácidos, (tiempo aproximado 2 horas).
- Enfriar el vaso de precipitados que contiene la muestra digerida y trasvasar cuantitativamente a un balón aforado de 25 ml.
- Adicionar 125  $\mu$ l de solución de itrio 1000 ppm (estándar interno) y aforar con agua desmineralizada.

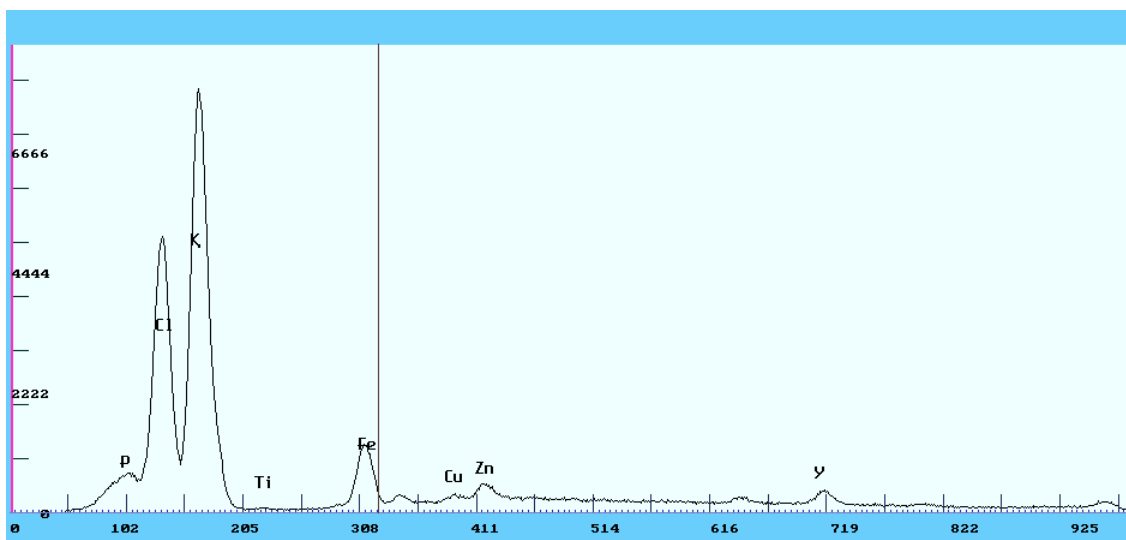
##### Cuantificación

- Agregar 125  $\mu$ l de estándar interno de itrio 1000 ppm a cada balón de 25 ml que contiene cada muestra digerida y aforar con agua desmineralizada.
- Encender el equipo de Fluorescencia de Rayos X, fijando las condiciones de operación en 30 Kv, 20 mA y 200 seg.
- Calibrar el equipo en energías con respecto al Si y al Rh.
- Aplicar 15  $\mu$ l de la muestra en el centro del reflector de cuarzo y se secar con la lámpara IR (aproximadamente 5 minutos).
- Colocar el reflector de cuarzo con la muestra seca en el detector del equipo de rayos X y obtener el espectro.
- Registrar las respectivas áreas de cada elemento presente en la muestra analizada y comparar con la curva de calibración multielemental que contiene los elementos de interés en una concentración de 5 ppm de cada uno y además el estándar interno de itrio a la misma concentración.
- Grabar el espectro obtenido, y cuantificar cada metal comparando las áreas del espectro con la curva de sensibilidad multielemental. Los resultados obtenidos se expresan en ppm.

##### **Modificación:**

Se utilizó la ceniza obtenida en el análisis proximal para la determinación de los minerales. La ceniza se homogenizó y se disolvió en agua destilada a la que se añadió HCl concentrado gota a gota justo hasta el punto de eliminar cualquier turbidez en la muestra y luego se llevó a volumen (25 mL) con agua destilada.

## Anexo 4 Resultados Análisis de Minerales por TFRX



Elemento	Area	Concentración (mg/l)
P	5735.3115	36.4325
Cl	61336.8867	371.0931
K	105306.2109	250.1257
Ti	316.1922	0.4747
Fe	16154.2764	17.2333
Cu	868.6790	0.6898
Zn	3817.9651	3.3149
Y	3639.1567	5.3158

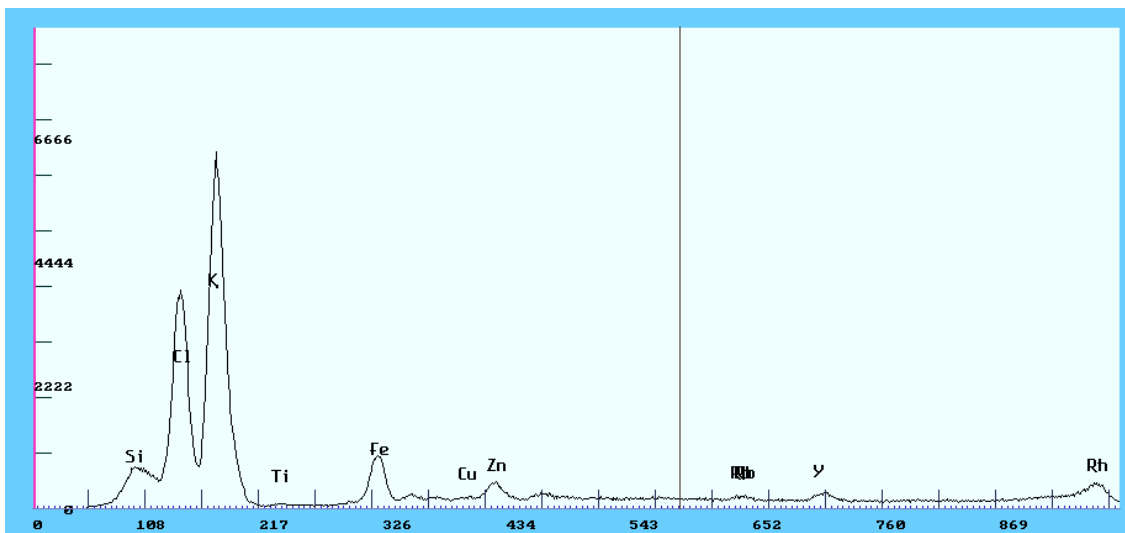
Czs1 30Kilovoltios, 0.32 miliamperios, 300 segundos, 20 microlitros.

Peso de muestra: 0.1014 g

Volumen de la muestra: 25 mL

Muestra de cálculo para determinar la concentración de cada uno de los elementos de interés:

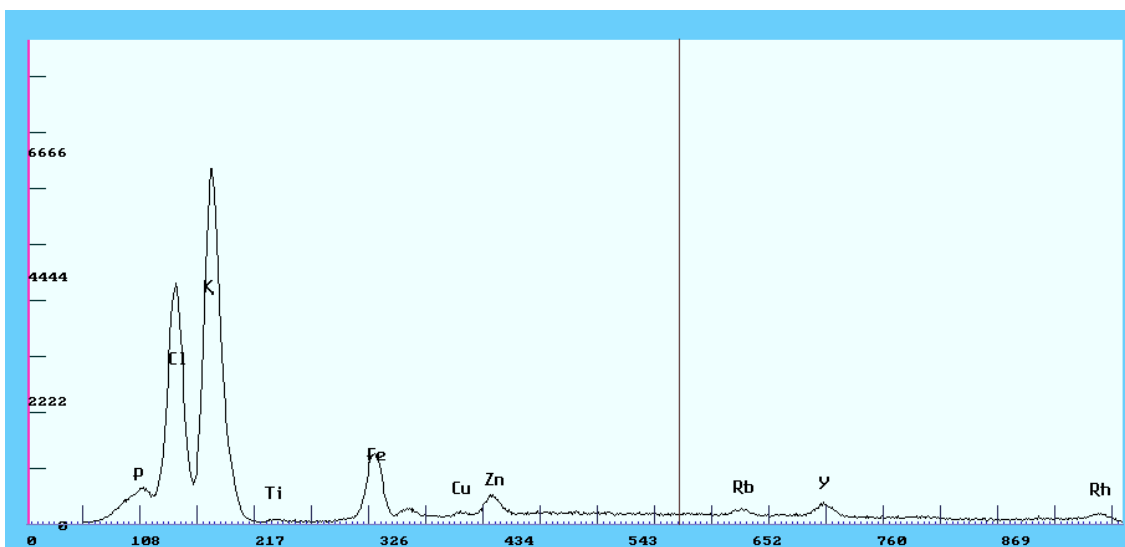
$$\frac{250.1257 \text{ mg K}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{25 \text{ mL}}{0.1014 \text{ g ceniza}} \times \frac{0.1097 \text{ g ceniza}}{\text{g hongo seco}} = 6.76 \text{ mg K/g hongo seco}$$



Elemento	Area	Concentración (mg/l)
Si	8387.5186	0.0000
Cl	45742.1055	527.2151
K	83169.0547	376.3366
Ti	366.5338	1.0484
Fe	11844.2813	24.0713
Cu	237.9621	0.3600
Zn	4110.7505	6.7995
Rb	582.9223	1.2672
Rb	850.1906	1.8482
Y	1910.2504	5.3158
Rh	5230.7656	No Detectable

Czs 3 30Kilovoltios, 0.32 miliamperios, 300 segundos, 20 microlitros.

Peso de la muestra: 0.1139



Elemento	Area	Concentración (mg/l)
P	4988.6631	35.0100
Cl	50742.6563	339.1641
K	85141.3047	223.4190
Ti	388.8842	0.6451
Fe	17164.6465	20.2298
Cu	407.3901	0.3574
Zn	4683.2007	4.4922
Rb	1478.5530	1.8640
Y	3294.0127	5.3158
Rh	2229.0271	No Detectable

Czs2 30Kilovoltios, 0.32 miliamperios, 300 segundos, 20 microlitros.

Peso de la muestra: 0.1055

Resultados de la determinación de minerales

	cz1	cz2	cz3	promedio	desviación
Potasio mg/g	<b>6.76</b>	<b>5.81</b>	<b>9.06</b>	<b>7.21</b>	<b>1.67</b>
Hierro mg/g	<b>0.47</b>	<b>0.53</b>	<b>0.58</b>	<b>0.53</b>	<b>0.06</b>
Cobre mg/g	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
Zinc mg/g	<b>0.09</b>	<b>0.12</b>	<b>0.16</b>	<b>0.12</b>	<b>0.04</b>

## ANEXO 5

### Determinación de Fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

#### Soluciones

Reactivo de Folin-Ciocalteu (FC): puede adquirirse ya preparado comercialmente, a una concentración 2 N. Diluirlo a una concentración 1 N. La composición del reactivo es la siguiente: 100 g de tungstato de sodio, 25 g de molibdato de sodio, 50 mL de ácido fosfórico 85%, 100 mL ácido clorhídrico concentrado, 150 g sulfato de litio, 750 ml agua destilada. Debe almacenarse en refrigeración (4° C) y no usarse si el color cambia de amarillo a verde oliva.

Solución de carbonato de sodio al 20%: pesar 40 g de carbonato de sodio decahidratado, disolver en 100-150 mL agua destilada, llevar a 200 mL una vez disuelto. Para prepararlo a partir de carbonato de sodio anhidro, el procedimiento es el siguiente: pesar 200 g de carbonato de sodio anhidro y disolver en 800 mL de agua destilada, llevar a ebullición y dejar enfriar, añadir unos cristales de carbonato de sodio anhidro, dejar reposar 24 horas y filtrar.

Solución estándar de ácido gálico (GA): en un balón aforado de 1000 L, disuelva 0.1000 g de ácido gálico seco en 15 ml de etanol y lleve a volumen con agua destilada. Guardar en refrigeración hasta por 2 semanas en un frasco bien cerrado. Puede abrirse diariamente para preparar la curva de calibración.

Soluciones de ácido gálico para la curva de calibración: añada 0,1,2,3,5,10 mL de la solución estándar de GA a balones aforados de 100 ml y lleve a volumen con agua destilada.

#### Solución extractora (SE)

Mezclar 80 mL de metanol y 20 mL de agua y 1 ml de HCl concentrado.

#### Preparación de la muestra

Extraer 200 mg de muestra con 10 mL de solución extractora, agitando por 2 horas a temperatura ambiente o bien, colocar en un aparato de ultrasonido e irradiar por 30 minutos (irradiar 10 minutos, esperar 5 minutos y volver a irradiar 10 minutos y repetir). Centrifugar a 1000g por 30 minutos y separar el sobrenadante, transferir a un matraz aforado de 25 mL, aforar con solución extractora y reservar en refrigeración para su análisis. De ser necesario, almacenarlo en viales ámbar.

#### Preparación de la reacción de color

En un tubo de ensayo coloque 200 uL de solución de muestra, 50 uL de estándar, añada 4.40 mL de agua, 200 uL del reactivo FC y mezcle bien, luego de 8 min añada 600 uL de solución de carbonato de sodio. Incube a 40° C por 30 minutos y lea la absorbancia a 765 nm. Debe prepararse una curva de calibración nueva cada día de trabajo. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico.

Muestra de cálculo para determinar el contenido de fenoles totales:

$$\frac{148.0245 \text{ mg fenoles}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{25 \text{ mL}}{0.2039 \text{ g hongo}} \times \frac{50 \text{ uL}}{200 \text{ uL}} = 4.54 \text{ mg fenoles/g hongo}$$

Ecuación de la curva de calibración para las muestras 1 a 4:

$$\text{Absorbancia} = 0.0010 \text{ concentración} + 0.0211 \quad r = 0.993588$$

Ecuación de la curva de calibración para las muestras 5 a 8:

$$\text{Absorbancia} = 0.0010 \text{ concentración} + 0.0049 \quad r = 0.997962$$

Resultados de la cuantificación de fenoles totales. Datos originales y resultados de cálculo.

Fenoles totales

Muestra no.	absorbancia	mg/1000 ml	g/25 ml	g/g hongo
1	0.168	148.0245	0.2039	4.54
2	0.158	137.9186	0.1983	4.35
3	0.182	163.0750	0.1849	5.51
4	0.210	190.9020	0.2162	5.52
5	0.181	173.7444	0.1977	5.49
6	0.246	236.9893	0.1996	7.42
7	0.210	201.8250	0.2063	6.11
8	0.212	203.9752	0.1929	6.61
			promedio	5.69
			desviación	1.02

## ANEXO 6

### FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADO COMO RUTINA. Metodología utilizada en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales LIPRONAT

**Solución madre:** Pesar 1.5g de material vegetal molida y pasar a un balón de reflujo, adicionar 100ml de etanol al 60% y poner a reflujo en un baño de agua durante una hora. Dejar enfriar y filtrar, pasar el filtrado a un balón aforado de 250ml. Agregar otros 100ml de etanol al 60% al material vegetal y llevar nuevamente a reflujo durante una hora. Dejar enfriar, filtra y juntar con el filtrado anterior. Aforar hasta 250ml con etanol al 60%.

**Preparación de referencia:** Pesar 10mg de la sustancia de referencia de rutina y disolver en metanol absoluto llevando al aforo a 10ml.

**Solución 1:** Colocar 2.0ml de la muestra y 2.0ml de cloruro de aluminio al 2% en un matraz aforado de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.

**Solución 2:** Colocar 2.0ml de la muestra en un matraz de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.

**Solución 3:** Colocar 2.0ml de la solución de referencia y 2.0ml de cloruro de aluminio al 2% en un matraz de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.

**Solución 4:** Colocar 2.0ml de la solución de referencia en un matraz aforado de 25ml y llevar al aforo con metanol absoluto.

**Procedimiento:** Medir la absorbancia de la solución 1, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 2. Medir la absorbancia de la solución 3, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 4.

#### Cálculos:

$$\text{ug de flavonoides en base a rutina} = \frac{A_m}{A_r} \times \frac{\text{ug rutina}}{\text{g muestra}} \times \frac{250 \text{ ml muestra}}{10 \text{ ml rutina}} = \text{ug rutina/g muestra}$$

Donde:

$A_m$  = Absorbancia de la muestra

$A_r$  = Absorbancia de la solución de rutina

Muestra	Absorbancia	Diferencia	Promedio	Peso	Contenido de flavonoides ug/g
Blanco de referencia	0.74469				
Referencia	1.6836	0.93891	0.93891	10100 ug	
Blanco muestra	$4.9920 \times 10^{-2}$				
Mx 1er repetición	$7.1041 \times 10^{-2}$	0.02112		1.5279 g	5.948
Mx 2da repetición	$5.8886 \times 10^{-2}$	0.00897		1.5279 g	2.525
Mx 3era repetición	$5.7738 \times 10^{-2}$	0.00782	0.01264	1.5279 g	2.202
				promedio	3.56
				desv. Est.	2.07



## ANEXO 7

### **Tamizaje de Actividad Antibacteriana *In Vitro*. Peo No. 4. Laboratorio de Bioensayos. Departamento de Citohistología. Escuela de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.**

#### **MATERIALES Y EQUIPO**

- Agar Muller Hinton
- Asa de nicromo en argolla
- Autoclave
- Cajas de petri simples
- Caldo tripticasa soya
- Campana bacteriológica
- Campana bacteriológica con flujo laminar
- Etanol al 50%
- Etanol al 70%
- Incubadora a 36°C
- Mechero
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas de 200 µL
- Puntas azules de 1000 µL
- Plantilla para siembra
- Refrigeradora
- Solución salina
- Tubos con tapón de rosca de 15 mL

#### **PROCEDIMIENTO**

##### **Disolución del extracto**

- En la balanza analítica pesar 30 mg de extracto a ensayar y disolverlo en 3 mL de etanol al 50% (hacer cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo).
- Agitar en un vortex hasta que este bien disuelto. Si no se disuelve utilizar un sonicador. En el caso de extractos con disolventes apolares agregar 25µL de dimetilsulfoxido (DMSO).
- Filtrar el extracto.

##### **Filtración de extracto**

- Trabajar la filtración en la campana de flujo laminar (previamente limpia, ver PEO de limpieza de campana).
- Aspirar el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 mL.
- Desenroscar la aguja y enroscar en la jeringa el filtro de 0.45 um de diámetro.
- En un frasco estéril recibir el filtrado haciendo pasar la disolución del extracto por el filtro lentamente.

##### **Preparación de Agar-Planta**

- Preparar tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar). Esterilizar a 121°C durante 15 min, dejar enfriar a 50°C.

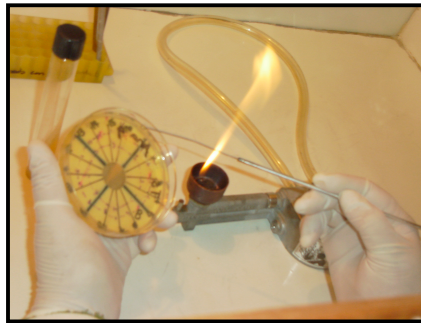
- En una caja de petri simple agregar 1.0 mL de la solución del extracto filtrado (este debe tener una concentración de 10 mg/mL) y los 9 mL de agar Mueller Hinton. Tapar la caja y homogenizar con movimientos circulares. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL.
- Dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 h, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

### Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en una caja de petri con agar tripticasa soya, incubar 36°C durante 24 h.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, incubar a 36°C durante 24 h.
- Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).

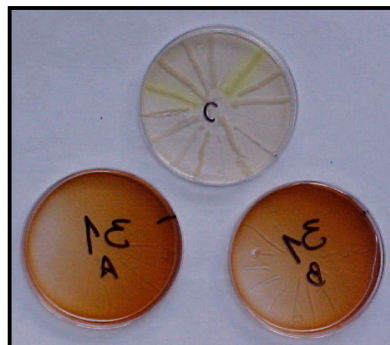
### Demostración de la actividad antibacteriana

- Inocular en las cajas con agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 min e incubar a 36°C durante 24 h.
- Utilizar como control negativo 9 mL de agar Muller Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%.



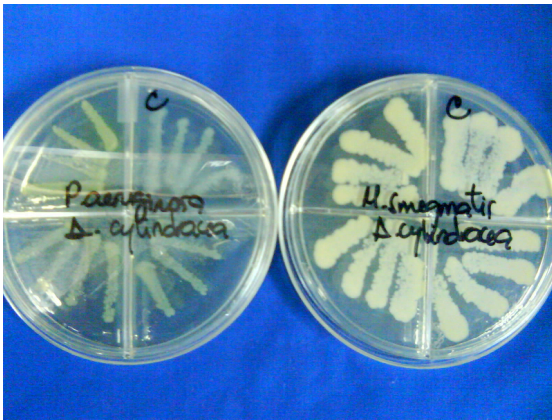
### Interpretación de resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

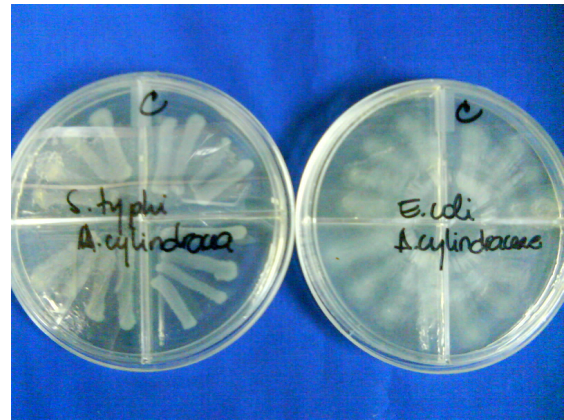


## ANEXO 8

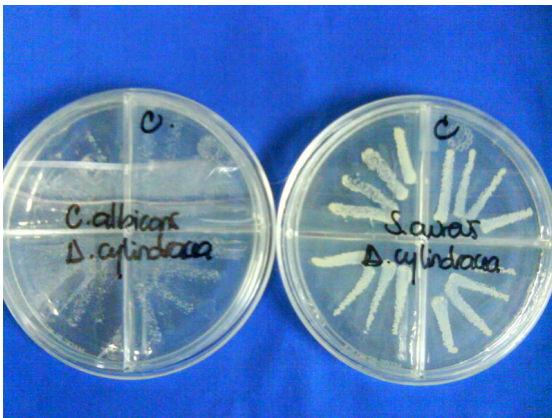
### Resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana



1



2



3



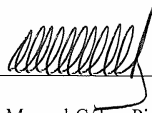
4

1. *Pseudomona aeruginosa* y *Mycobacterium smegmatis*
2. *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*
3. *Candida albicans* y *Staphilococcus aureus*
4. *Bacillus subtilis*

Fotografías: Keila Guerrero



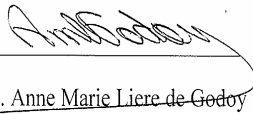
Licda. Diana Elizabeth Pinagel Cifuentes  
Autor



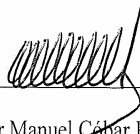
Dr. Óscar Manuel Cobar Pinto Ph.D.  
Asesor



Dr. Juan Francisco Pérez Sabino Ph.D.  
Revisor



MSc. Anne Marie Liere de Godoy  
Directora, Escuela de Estudios de Postgrado



Dr. Óscar Manuel Cobar Pinto Ph.D.  
Decano