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

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE DIEZ BASIDIOMICETOS COMESTIBLES EN GUATEMALA

KAREN YESENIA BELLOSO ROJAS
CYNTHIA IVONNE GONZÁLEZ CORDÓN
ANA REBECA SUÁREZ DÍAZ

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2012.

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

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE DIEZ BASIDIOMICETOS COMESTIBLES EN GUATEMALA

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

KAREN YESENIA BELLOSO ROJAS
CYNTHIA IVONNE GONZÁLEZ CORDÓN
ANA REBECA SUÁREZ DÍAZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2012.

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

ACTO QUE DEDICAMOS:

A Dios nuestro padre

Por ser nuestro guía, darnos fortaleza en todo momento y permitirnos alcanzar una meta más en nuestras vidas.

A nuestros Padres

Julio González y Silvia Cordón, Julio Suárez y Beatriz Díaz, Ismael Belloso y Reina Rojas. Por su gran amor, por ser unos padres maravillosos y excepcionales, quienes con esfuerzo y dedicación han estado en cada etapa de nuestra vida, brindándonos consejos y ejemplo de perseverancia siempre. Gracias a ellos estamos hoy aquí. ¡Nuestros triunfos son suyos!

A nuestros Hermanos y Hermanas

Por su apoyo y amor, siendo además grandes amigos para toda la vida.

A nuestros familiares y amigos

Por su compañía, apoyo, paciencia y cariño.

A nuestro país, Guatemala.

Que nuestro servicio como profesionales pueda contribuir a mejorar nuestra bella nación.

ÍNDICE

		Págs.
I.	ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	01
II.	RESUMEN	03
III.	ANTECEDENTES	04
A.	Basidiomicetos comestibles	04
B.	Basidiomicetos comestibles de Guatemala	04
C.	Bioactividad de basidiomicetos	05
D.	Actividad antioxidante	07
1.	Generalidades	07
2.	Sistema antioxidante	09
3.	Actividad antioxidante de basidiomicetos	10
E.	Metodologías para determinación de actividad antioxidante	12
1.	Método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	13
2.	Cuantificación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu	13
3.	Poder reductor del hierro	14
4.	Sistema de emulsión del ácido linoléico	14
5.	Método de ABTS (2,2´-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	14
F.	Fichas técnicas de basidiomicetos a estudiar	15
IV.	JUSTIFICACIÓN	26
V.	OBJETIVOS	27
VI.	HIPÓTESIS	28
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
A.	Universo de trabajo y muestra	29
B.	Obtención e identificación taxonómica de los basidiomicetos	29
C.	Métodos	29
1.	Desecación de hongos	29
2.	Obtención de extractos etanólicos por percolación	30
3.	Obtención de extractos acuosos por infusión	32
4.	Evaluación de la actividad antioxidante (métodos macrométricos)	32
a.	Cuantificación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu	32
b.	Cromatografía en capa fina	34

c.	Reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)	35
d.	Decoloración del radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)	38
D.	Diseño de la investigación	40
E.	Análisis estadístico	40
VIII.	RESULTADOS	41
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
X.	CONCLUSIONES	53
XI.	RECOMENDACIONES	54
XII.	REFERENCIAS	55
XIII.	ANEXOS	63

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Los basidiomicetos son fuente de alimento desde tiempos remotos. Contienen todos los aminoácidos esenciales, así como amidas y los aminoácidos no esenciales más comunes también contienen vitaminas B, D y ácido fólico además de minerales como calcio, potasio, sodio y fósforo por lo que pueden proporcionar una buena parte de las necesidades dietéticas diarias (Sommerkamp, 1990).

En China se cultivan desde el año 600 a. C., mientras que en Europa se empezó hacia 1650 d. C. Hoy son cultivadas muchas especies que crecen en estiércol, paja, desechos de arroz y otros sustratos de bajo costo comercial (Chang, 1987).

El interés en los efectos farmacológicos de los hongos ha aumentado notablemente como lo demuestra la cantidad de estudios científicos realizados por muchos grupos de investigación, principalmente en hospitales e instituciones de investigación en Europa, Japón, China y Estados Unidos. En países asiáticos los hongos han sido utilizados como agentes terapéuticos y profilácticos de enfermedades metabólicas, infecciosas, reumatológicas, etc. (Ching et al., 2006).

En cuanto a las propiedades antioxidantes de los hongos se han encontrado tanto en cuerpos fructíferos como en micelio, componentes con capacidad antioxidante; los cuales presentan un efecto protector frente a los radicales libres. Los radicales libres son especies químicas muy reactivas que pueden provocar reacciones incontroladas en el organismo, provocando diferentes daños asociados al estrés oxidativo como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Imark, Kneubühl & Bodmer, 2001).

Los antioxidantes naturales u otros compuestos pueden neutralizar los radicales libres como superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo, que son mutágenos producidos por la radiación, el metabolismo, ozono, infecciones, etc., y son de importancia central en la prevención de estrés oxidativo; enfermedades como cáncer, artritis reumatoide y aterosclerosis, así como en procesos degenerativos asociados con el envejecimiento (Halliwell, Gutteridge & Cross, 1992; Ching, et al., 2006).

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación de productos naturales que se llevó a cabo en la unidad de Bioensayo del Departamento de Citohistología que incluye los proyectos “Actividad antioxidante de diez especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutriceuticos” (Proyecto FODECYT 28-2007) y

“Composición química y actividad inmunomoduladora y biocida de basidiomicetos comestibles de Guatemala” (Proyecto FODECYT 30-2007); tuvo como objetivo principal determinar la existencia de actividad antioxidante de extractos de basidiomicetos comestibles en Guatemala, presentando el fundamento teórico, planificación y metodología que se utilizó.

II. RESUMEN

El sistema antioxidante se encarga de proteger los tejidos atrapando los radicales libres, interviniendo en los pasos de iniciación, propagación o finalización de procesos oxidativos. Es necesario su reemplazo constante por medio de la ingesta en la alimentación. Los hongos han demostrado poseer actividad antioxidante pues cuentan con una amplia variedad de moléculas secuestrantes de radicales libres como polisacáridos y polifenoles.

El presente estudio tuvo como objetivo la determinación de actividad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de las especies de basidiomicetos comestibles: *Agaricus aff. bisporus* (J.E. Lange) Imbach, *Agaricus brunnescens* Peck, *Armillariella polymyces* (Pers.) Singer & Clémençon, *Amanita garabitoana* Tulloss, Halling & G.M. Muell., *Boletus edulis* Bull., *Cantharellus lateritius* (Berk.) Singer, *Laccaria amethystina* (Huds.) Cooke, *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Neolentinus ponderosus* (O.K.Mill.) Redhead & Ginns, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Se cuantificó la cantidad de fenoles totales de cada extracto mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. También se determinó la actividad antioxidante por medio de un método cualitativo por cromatografía en capa fina (CCF) y dos métodos macrométricos cuantitativos por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y ensayo de decoloración del radical catiónico del ácido 2,2'-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y se utilizaron soluciones estándar como referencia para verificar la eficacia de los ensayos.

Se determinó por medio de todas la técnicas (cualitativa y cuantitativas) que todas las especies presentan alguna actividad antioxidante. Los extractos acuosos mostraron mayor actividad antioxidante que los extractos etanólicos en todas las técnicas cuantitativas utilizadas. La especie que mostró mayor actividad antioxidante tanto en su extracto acuoso como etanólico fue *B. edulis*.

III. ANTECEDENTES

A. Basidiomicetos comestibles

En una revisión realizada se menciona a los basidiomicetos como la clase de hongos más evolucionada y desarrollada. Éstos comprenden el segundo grupo en cantidad de los hongos auténticos o verdaderos. Existen aproximadamente 25,000 especies las cuales en su mayoría son saprofíticos, destructores de la madera como *Serpula lacrymans* (Wolfen) J. Schrot; algunos se encuentran asociados simbióticamente a los árboles en forma de micorriza, otros se encuentran como parásitos severos como *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm , que destruye una amplia variedad de plantas leñosas y arbustos (Mendoza & Montoya, 1981).

En países como China y Japón, los hongos comestibles y medicinales han sido utilizados como agentes terapéuticos y profilácticos en enfermedades infecciosas, metabólicas, cáncer y en procesos degenerativos asociados con el envejecimiento (Halliwell et al., 1992; Ching, et al., 2006).

B. Basidiomicetos comestibles de Guatemala

Los registros de fósiles encontrados son evidencia de la existencia de los hongos desde tiempos remotos. *Ocox* es el nombre con que los Cakchiqueles y Quichés agrupaban a los hongos, *Xibalbay-Ocox* son los hongos del inframundo que hacen perder el jucio, *Muxan-Ocox* hongo que enriquece al que lo come y por último *Kauilja-Ocox* hongo del rayo relacionado con el Dios Huracán del Popol Vuh (Memorias del I Coloquio Internacional de Mayistas, 1987).

El primer muestreo de macromicetos del país incluía algunas especies silvestres de venta en mercados regionales, fue realizado por Karl Sapper en 1948, quien colectó y comparó con los del este de México y Estados Unidos de Norteamérica (Como se cita en Lowy, 1971).

En Guatemala ya se han reportado diversos estudios sobre basidiomictetos comestibles, por ejemplo: en 1983 se realizó un estudio en la ciudad de Guatemala y los municipios de Mixco y San Juan Sacatepéquez en el cual se identificó especies comestibles como *L. deliciosus, Lactarius indigo* (Schwein.) Fr., *Lycoperdon perlatum* Pers., *Russula olivacea* (Schaeff.) Fr. y *Schizophyllus commune* Fr .(Argueta, 1983). Otro estudio realizado

en 1984 acerca de macromicetos del biotopo universitario "Licenciado Mario Dary Rivera", en el cual se encontró que son mucho más abundantes las especies comestibles que las venenosas. Las especies comestibles identificadas más importantes son: *C. cibarius, Laccaria laccata* (Scop.) Cocke, *L. deliciosus, L. indigo, P. ostreatus* y algunas especies de los géneros *Boletus, Russula* y *Suillus* (Sommerkamp, 1984).

En el año 1985, en un estudio se describió la primera especie endémica en el país la cual se le conoce como *Morchella guatemalensis* Guzmán, M. F. Torres & Logem., la cual se encontró en bosques de encino y ciprés en el departamento de Chimaltenango (Guzmán, et al., 1985). En 1990 en un estudio realizado en los mercados de Guatemala se identificaron 21 especies de hongos comestibles (Sommerkamp, 1990).

En un estudio realizado en 2003 se presenta un listado de 70 especies de hongos comestibles, de las cuales 21 constituyen nuevos reportes para Guatemala. Se indica además la distribución de cada una de ellas. De las especies estudiadas, 9 pertenecen a 5 géneros de ascomicetos y 61 a 31 géneros de basidiomicetos. Entre los mismos se puede mencionar a *Agaricus campestris* Schwein (Tecpán), *Agrocybe aegerita* (V. Bring.) Singer (Tecpán, San Antonio Sacatepéquez), *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. (Tactic, Comalapa, Tecpán, Patzún, Uspantán), *L. amethystina* (Comalapa, Tecpán, Patzún, Uspantán, Chichicastenango, Totonicapán), entre otros (Bran, Flores, Morales & Cáceres, 2003).

C. Bioactividad de basidiomicetos

El número de especies de hongos sobre la tierra está estimado en 140,000; sin embargo, solo el 10% (aproximadamente 14,000 especies citadas) son conocidas (Dickinson, 1979). Los hongos son fuente de alimento y medicina desde tiempos remotos. Se han utilizado para mantener y mejorar la salud y para aumentar la calidad y tiempo de vida. Son fuente de compuestos bioactivos útiles en el desarrollo de medicinas naturales por su valor nutracéutico, por posibilitar la preparación de nutricéuticos y productos farmacéuticos (Curvetto, 2009).

Hacia finales de los años sesenta tanto los científicos orientales como los occidentales comenzaron a investigar los mecanismos por los cuales ciertos hongos tenían efectos positivos sobre la salud. La primera investigación exitosa puso al descubierto los efectos antitumorales de extractos (obtenidos en agua caliente) de varias especies de hongos

(Ikekawua, Fukuoka, Maeda, Nakanishi & Uehara, 1969). Los componentes activos principales demostraron ser polisacáridos, específicamente ß-D-glucanos. Chihara y sus colaboradores aislaron de los cuerpos fructíferos de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler*)* un polisacárido antitumoral, soluble en agua que se nombró Lentinan. Éste era un descubrimiento mayor dado que el Lentinan demostró una fuerte actividad antitumoral, previniendo el desarrollo de tumores provocados por virus y compuestos químicos en ratones y otros modelos experimentales de estudio (Chihara, Fukuoka, Hamuro, Maeda & Sasaki, 1969; Zakany, Chihara & Fachet, 1980).

En Japón se desarrolló una preparación muy popular y eficaz a partir del hongo *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (conocido previamente como *Coriolus versicolor* (L.) Quél.). Un polisacárido péptido de este hongo con el nombre de Krestin, fue aceptado para el uso contra varios tipos de cáncer y fue cubierto por el plan oficial de salud japonés. El Krestin contiene 75% de glucanos y 25% de proteína (Hiroshi & Takeda, 1993). En los años 90, este compuesto significó el 25% de las drogas anticáncer en Japón, con ventas por 350 millones de dólares (Mizuno, 1999). Un producto similar se desarrolló en China con otra cepa de *T. versicolor*, bajo el nombre péptido (Rau et al., 2009).

Durante los últimos veinte años, el interés en los aspectos medicinales de los hongos ha aumentado notablemente como lo demuestra la gran cantidad de estudios científicos realizados por un gran número de grupos de investigación, principalmente de hospitales e instituciones de investigación en Europa, Japón, China y los Estados Unidos, con trabajos en un amplio espectro de diferentes publicaciones (Martínez et al., 2000).

Se han realizado diversos estudios sobre la bioactividad de los hongos más recientemente, entre ellos se describe la plectasina, un antibiótico aislado del hongo saprofítico *Pseudoplectania nigrella* (Pers.) Fuckel, que es especialmente activo contra el *Streptococcus pneumoniae*, incluso contra aquellas cepas que son resistentes a los antibióticos convencionales. Estos hallazgos identifican a los hongos como una nueva fuente de las sustancias antimicrobianas conocidas como defensinas. (Mizuno, 1995; Oliveira, Da Silva & Tallarico, 2010).

Existe determinada actividad inmunitaria de polisacáridos derivados de hongos, y ésta se debe a los β-glucanos en su contenido, los cuales son responsables de algunas respuestas inmunes como la generación de especies reactivas de oxígeno, liberación de citocinas,

liberación de metabolitos del ácido araquidónico y formación de óxido nítrico (Masihi, 2002; Schepetkin & Quinn, 2006).

Por medio de un estudio realizado recientemente se demostró la actividad sobre el sistema inmune humano de dos extractos del hongo comestible *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, ya que ambos extractos poseen actividad proliferativa *in vitro* sobre linfocitos extraídos a partir de sangre venosa humana (Lorenzana, 2009).

Con el mismo objetivo se elaboró otro estudio demostrando la actividad inmunomoduladora de extractos tanto acuosos como etanólicos, preparados a partir de los hongos comestibles *A. polymyces, C. lateritius, L. amethystina, L. deliciosus* y *P. ostreatus*, por medio de ensayos *in vitro* para la determinación de acción sobre la población linfocítica y sobre el sistema sérico del complemento humano, comprobando que las cinco especies de basidiomicetos presentan una actividad significativa (Rodríguez, Ramírez, González, Oliva & Sánchez, 2009).

En la actualidad, usando modernas herramientas analíticas los científicos han aislado e identificado componentes específicos que pueden ya sea destruir o por lo menos debilitar tres de las enfermedades asesinas de la humanidad: el cáncer, enfermedades del corazón y el SIDA (Curvetto, 2009).

D. Actividad antioxidante

1. Generalidades

Un radical libre es una molécula que contiene uno o más electrones no apareados, es decir, que posee un electrón impar en órbita, por ejemplo un átomo de hidrogeno (H^-) es el radical libre más simple, superóxido e hidroxilo (O_2^- y OH^-) radicales con centro de oxígeno, triclorometilo (CCl_3^-) un radical con centro de carbono y óxido nítrico (NO^-) en el cual el electrón no apareado se localiza entre ambos átomos (Vilar, Guzmán & Hicks, 1996).

Para que una molécula sea estable, todos sus electrones deben hallarse compensados por protones. La molécula que tiene uno o varios electrones no apareados es inestable y tiende a buscar moléculas estables para formar combinaciones con ellas y saturar sus electrones. Este proceso se denomina oxidación y puede dar lugar a una reacción en cadena muy perjudicial para el organismo. Es por ello que los radicales libres son moléculas muy reactivas que pueden causar daño a las células e incluso la muerte celular. Las estructuras

dañadas más frecuentemente son: ácidos grasos insaturados en las membranas celulares, carbohidratos, proteínas y ADN (Halliwell et al., 1992).

En el organismo humano se generan radicales libres como por ejemplo el radical superóxido (O_2^-). Este puede generarse por accidentes químicos, ya que muchas moléculas en el organismo reaccionan directamente con el oxígeno y dan lugar a superóxido (O_2^-). Entre éstas se encuentran las catecolaminas, los tetrahidrofolatos y algunas sustancias de las cadenas de transporte de electrones mitocondriales y del retículo endoplásmico (Halliwell et al., 1992).

La oxidación es fundamental en el ser humano para la producción de energía, pero cuando la producción de oxígeno es incontrolada y existe un desequilibrio en la acción protectora de enzimas como superóxido dismutasa y catalasa o compuestos como el ácido ascórbico, tocoferoles y glutatión que puede implicar la aparición de muchas enfermedades como cáncer, artritis reumatoide y aterosclerosis; así como en procesos degenerativos asociados con el envejecimiento (Mau, Lin & Song, 2002).

Millones de radicales atacan diariamente a las células. El hecho de que necesiten tantos años para causar daños mayores es un tributo a la eficacia de los antioxidantes que produce el propio organismo para neutralizarlos. El problema para el sistema se produce cuando tiene que tolerar de forma continuada un exceso de radicales libres. El exceso es producido mayormente por contaminantes externos que penetran en el cuerpo. La contaminación atmosférica, el humo de tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres que se ingieren o inhalan. Este exceso no puede ser eliminado por el cuerpo y en su labor de captación de electrones, los radicales libres dañan las membranas de las células llegando finalmente a destruir y mutar su información genética, facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades (Soares, Dinis, Cunha & Almeida, 1997; Ghiselli, Serafini, Maiani, Azzini & Ferro-Luzzi, 1995; Gonçalves, Almeida & Dinis, 1998).

Por estas razones los radicales libres deben ser inactivados, en caso contrario, su reactividad química puede dañar varios tipos de macromoléculas celulares, incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, resultando en daño celular (Fürst, 1998).

2. Sistema antioxidante

El sistema antioxidante es el encargado de proteger a los tejidos de los efectos de los radicales libres, atrapándolos. Para llevar a cabo su función es necesario un constante reemplazo de estos ya sea por medio de la ingesta o intercambio celular. Los antioxidantes intervienen en cualquiera de los siguientes pasos: iniciación, propagación o finalización de los procesos oxidativos (Laranjinha, Almeida & Madeira, 1992; Cui, Kim & Park 2004).

El exceso de especies de oxígeno reactivas es inactivado generalmente por moléculas antioxidantes endógenas y exógenas que poseen la habilidad, incluso a concentraciones bajas, de retrasar o inhibir la oxidación de un substrato. Pueden actuar removiendo o disminuyendo las concentraciones locales de uno o más de los participantes de una reacción tales como el oxígeno, especies de oxígeno reactivas, iones metálicos, que catalizan la oxidación, o al interferir con una cadena de reacciones (Cui et al., 2004).

Los antioxidantes se pueden clasificar en tres grupos principales que son:

a) Antioxidantes primarios

Estos previenen la formación de nuevos radicales libres. Esto lo consiguen convirtiendo los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Por ejemplo: super óxido dismutasa convierte el O_2^- en H_2O_2, glutatión peroxidasa convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres y las proteínas de unión a metales como la ferritina y ceruloplasmina que limitan la disponibilidad de Fe (II) necesaria para formar el radical OH^- (Halliwell et al., 1992; Ghiselli et al., 1995; Laranjinha et al., 1992; Hu, Louie, Cross, Motchnik & Halliwell, 1993).

b) Antioxidantes secundarios

Capturan los radicales, evitando la formación de las reacciones en cadena de radicales libres. Ejemplos:

– Vitamina E (α-tocoferol): es la primera línea de defensa contra peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados contenidos en fosfolípidos mitocondriales, del retículo endoplásmico y plasmática. Los tocoferoles actúan interrumpiendo reacciones de cadenas con radicales libres como resultado para transferir un hidrogeno fenólico a un radical peroxilo libre de un ácido graso poliinsaturado peroxidado.

– Vitamina C (ácido ascórbico): considerado como el antioxidante más importante en el plasma humano ya que posee la habilidad de secuestrar radicales en la fase acuosa, incrementando la formación de radicales por el reciclamiento reductivo de los iones metálicos.

– Vitamina A (β-caroteno): que actúa por medio de la estabilización de radicales peróxidos orgánicos libres dentro de su estructura alquilo conjugada (Cui, 2004; Hu, et al., 1993; Halliwell et al., 1992; Laranjinha, et al., 1992).

c) Antioxidantes terciarios

Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Halliwel, et al., 1992).

Los antioxidantes son ingeridos diariamente en la alimentación ya que se encuentran en frutas, verduras, raíces, tubérculos, hierbas, aceites vegetales y frutos secos (Hoffman-La Roche ltd, 1994). Es por ello que en la actualidad se ha enfocado varios estudios de investigación en la determinación de la actividad antioxidante en plantas y hongos comestibles en varias partes del mundo.

En la búsqueda continua de extractos de plantas antioxidantes de América Central y Sur América. Aquino evaluó fitoquímica y biológicamente a *Tagetes lucida* Cav., que es conocida comúnmente como pericón y utilizada como condimento. Utilizando la técnica del DPPH mostró un efecto significativo en la remoción de radicales libres en comparación a α-tocoferol y un estándar de flavonoides (Aquino, Cáceres, Morelli & Rastrelli, 2002).

3. Actividad antioxidante de basidiomicetos.

Los hongos han demostrado poseer actividad antioxidante, la cual ha sido encontrada tanto en cuerpos fructíferos como en el micelio; usualmente poseen una amplia variedad de moléculas secuestrantes de radicales libres como polisacáridos y polifenoles (Liu, Ooi & Chang, 1997; Mau et al., 2002).

Las propiedades antioxidantes y la captación de radicales libres encontradas del contenido fenólico de extractos metanólicos de hongos, sugieren posibles funciones de protección debido a su capacidad para capturar metales, inhibir la lipoxigenasa y eliminación de los radicales libres (Ferreira, Baptista, Vilas-Boas & Barros, 2007).

Los hongos contienen una variedad de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, policétidos, terpenos y esteroides. Los fenoles son unos de los principales

componentes de la dieta que se han asociado con la inhibición de la aterosclerosis y el cáncer (Cheung, 2005).

Good, Sṁania, Pedrosa & Salvador (2006) en un estudio de revisión encontró que existe correlación directa entre los extractos de disolventes orgánicos de hongos, la actividad antioxidante y el contenido fenólico total; aunque la acción antioxidante sea planteada por otras sustancias como tocoferoles y β-caroteno. Por ejemplo *L. edodes* ha sido intensamente investigado, denotando en su composición la presencia de sustancias polares responsables de la actividad antioxidante indicando la importancia del shiitake como fuente de componentes de valor antioxidante.

Los efectos antioxidantes y la eliminación de radicales libres de los polisacáridos y triterpenoides de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. se muestran en diferentes modelos de daño oxidativo incluyendo daños de terc-butilhidroperóxido en macrófagos peritoneales de ratón, diabetes inducida por aloxano y en modelos experimentales de lesión hepática, demostrando la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por células endoteliales y de la adhesión de los monocitos a las células endoteliales (Lindquist, Timo & Jülich, 2005).

El componente p-terfenilo de *Thelephora ganbajun* M. Zang, *Thelephora aurantiotincta* Corner, *Boletopsis grisea* (Peck) Bondartsev & Singer, así como de *Paxillus curtisii* Berk., ha mostrado tener fuertes propiedades antioxidantes. Compuestos como betulina A de *Lenzites betulinus* (L.) Fr. es cuatro veces más activo en la eliminación de radicales libres que la vitamina E, en la inhibición de la peroxidación lipídica esta es también inhibida por la esterinas A y B de *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (Lindquist, et al., 2005).

Se ha medido la actividad antioxidante de *P. ostreatus*, en el daño hepático induciendo por CCl_4 en ratas. Se administró intraperitonealmente 2 ml/kg de CCl_4 a ratas durante 4 días, lo que provocó un considerable aumento de los niveles séricos de la transaminasa glutámica oxalacética, transaminasa glutámica pirúvica y fosfatasa alcalina. Luego de la adminitración del extracto de *P. ostreatus* se observó disminución en los valores de las transaminasas y fosfatasa alcalina por lo que se plantea un efecto hepatoprotector conferido por el extracto. Sugiriendo con estos resultados que un extracto de *P. ostreatus* es capaz de aliviar significativamente la hepatotoxicidad inducida por CCl_4 en ratas (Jayakumar, Ramesh & Geraldine., 2006).

Así también se ha evaluado la capacidad antioxidante de *Inonotus obliquus* (Ach. Ex Pers) Pilát, utilizando cuatro extractos del hongo con los cuales se evaluó la actividad antioxidante en contra del radical libre (DPPH), superóxido y radicales peroxilo, demostrando que el extracto de polifenoles tuvo un efecto protector en las células en contra de peróxido de hidrógeno, mientras que los polisacáridos, los extractos de triterpenoides y esteroides fueron ineficaces. Por lo que, *I. obliquus* tiene la capacidad para captar radicales libres a concentraciones superiores a 5 g/ml y que el extracto polifenólico puede proteger las células contra el estrés oxidativo (Cui, Kim & Park, 2005).

Un estudio acerca de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de *B. edulis* reflejó que, de tres hongos estudiados *B. edulis* fue el que presentó mayor eficacia en cuanto a propiedades antioxidantes. También en el mismo, fueron encontrados componentes antioxidantes naturales como tocoferoles totales (3,18 a 6,18 mg / g) y fenoles totales (5.67-5.81 mg / g) asociados (r = 0,636 a 0,907) con el valor de CI_{50} encontrado (Tsai, Tsai & Mau, 2006).

Un estudio portugués menciona que *L. amethystina* junto a otros 17 hongos posee una actividad antioxidante significativa. Las setas analizadas contienen poderosos antioxidantes como los fenoles (0.51-7.90 mg / g) y tocoferoles (0,02 a 8,04 mg / g) (Heleno, Barros, João, Martins & Ferreira, 2010). Y por último, se ha reportado un elevado potencial antioxidante en *A. bisporus* y *L. deliciosus* a través de ensayos químicos y comparaciones con los antioxidantes estándar como butilhidroxianisol (BHA), butilhidrositolueno (BHT), α-tocoferol entre otros (Elmastas, Isildak, Turkekul & Temur, 2007; Ferreira et al., 2007).

E. Metodologías para determinación de actividad antioxidante

Se han realizado variedad de estudios para la demostración y evaluación de la actividad antioxidante, para lo cual se han utilizado diversas metodologías, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Sin embargo las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* solo proporcionan una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Estas metodologías también se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción en: secuestro de radicales libres, medición del potencial de óxido reducción, inhibición de reacciones de oxidación y autooxidación (Kohen & Nyska, 2002).

Dentro de la variedad de estrategias para la determinación de actividad antioxidante, la más aplicada en las medidas *in vitro* es la capacidad antioxidante total en un compuesto, la cual consiste en la determinación de la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical (ABTS, DPPH, Poder reductor del Hierro-FRAP-); en las cuales, la pérdida de color ocurre en forma proporcional con la concentración (Kohen & Nyska, 2002).

1. Método de difenilpicrilhidrazilo (DPPH)

El difenilpicrilhidrazilo es un radical libre estable que puede aceptar un electrón o un radical de hidrógeno y volverse una molécula diamagnética estable. Al reaccionar el DPPH con agentes reductores adecuados, su electrón se enlaza y la solución pierde color estequiométricamente con el número de electrones tomados, lo cual es cuantificado espectrométricamente a 517 nm. La pérdida de color en la mezcla del ensayo, está determinada por las concentraciones de sustancia antioxidante (extracto), la concentración de DPPH y el tiempo de reacción. Tal reactividad ha sido ampliamente utilizada para evaluar tanto la habilidad de varias moléculas de actuar como recolectoras de radicales libres y la actividad antioxidante de extractos vegetales. La actividad se expresa en términos de la concentración de inhibición al 50 por ciento (CI_{50}), por ejemplo la cantidad del extracto o de la materia vegetal requerida para dar un 50 por ciento de disminución en la absorbancia en comparación con la solución blanco (Soares, Dinis, Cunha & Almeida, 1997).

2. Cuantificación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteau

Los compuestos fenólicos se han identificado como antioxidantes naturales eficaces. Las propiedades antioxidantes y anti-radicales de los extractos vegetales están relacionadas a la mayoría de compuestos fenólicos. Los grupos fenólicos son determinados espectrométricamente a 700 nm en base al método de Barness y colaboradores, en el que se utiliza una reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteau, una solución de Na_2CO_3 al 10 por ciento y utilizando ácido gálico como estándar. El contenido total de fenoles es calculado en equivalentes de ácido gálico y comparado con una curva estándar del mismo (Soares, et al., 1997; Singleton, & Rossi, 1965; Sharma, Hanna, Kauffman & Newman, 1995).

Este es un ensayo a base de transferencia de electrones e indica capacidad reductora, la cual ha sido normalmente utilizada para estimar el contenido de fenoles en materiales biológicos. Es un método simple, sensible y preciso, el cual puede ser utilizado en la

caracterización y estandarización de muestras botánicas y vegetales (Phipps, Sharap & Butterweck, 2007).

3. Poder reductor del hierro (FRAP)

Se ha reportado una correlación directa entre la actividad antioxidante y el poder reductor de ciertos extractos vegetales. La presencia de antioxidantes en los extractos provoca la reducción del Fe (III) a Fe (II). La cantidad de Fe (II) del complejo ferroso puede ser medida mediante la formación de azul Perl de Prusia a 700 nm (Kosem, Han & Moongkarndi, 2007).

4. Sistema de emulsión del ácido linoléico

La peroxidación lipídica provoca el desarrollo de rancidez y mal olor, considerándose el primer mecanismo cualitativo de deterioro de alimentos lipídicos y aceites. Las sustancias antioxidantes poseen la habilidad de proporcionar estabilidad a los alimentos y calidad. El método del tiocianato es determinado por el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica respecto al tiempo a una longitud de onda de 500nm. Los extractos vegetales pueden exhibir actividad antioxidante efectiva a cierta concentración y poseer la habilidad para detener la peroxidación lipídica. Los compuestos fenólicos y otros compuestos químicos presentes en los extractos pueden suprimir la peroxidación lipídica a través de diferentes mecanismos químicos, incluyendo quelación de radicales libres, transferencia de electrones, adición de radicales libres o recombinación de radicales (Mathew & Abraham, 2006).

5. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

Es un método para el cribado de la actividad antioxidante es reportado como un ensayo de decoloración aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos, incluyendo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes plasmáticos: El radical pre-formado monocatión ($ABTS^{\cdot+}$) es generado por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y es reducido en la presencia de antioxidantes donadores de protones. Durante la determinación de la actividad antioxidante se debe tomar en cuenta tanto la concentración del antioxidante como la duración de la reacción en la inhibición de la absorción del radical catiónico. Este ensayo claramente mejora, en diversas formas, al ensayo original (ensayo mioglobina férrica/ABTS) para la determinación de la actividad antioxidante. Primero, la química involucra la generación directa del radical monocatiónico ABTS sin involucrar un

radical intermedio. Segundo, es un ensayo de decoloración; por tanto, el radical catiónico es pre-formado previo a su adición al ensayo de sistemas antioxidantes, en lugar de que la generación del radical tome lugar continuamente en la presencia del antioxidante. Por consiguiente, los resultados obtenidos con el sistema mejorado pueden no siempre ser comparables con aquellos obtenidos usando el ensayo TEAC original. Tercero, es aplicable tanto para sistemas acuosos como lipofílicos (Re et al., 1999).

En Guatemala, desde 1996 en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han realizado más de 12 investigaciones sobre la actividad antioxidante únicamente en especies vegetales y jugos frutales (Barahona et al., 2002; Bolaños, 2003). En estos estudios se establecieron los procedimientos para evaluar la actividad antioxidante por medio de la reacción con DPPH, determinación de niveles de vitamina C por HPLC y cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu, evaluados mediante espectrofotometría. Se estudiaron los procedimientos de extracción más eficientes, se optimizaron los métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales y se evaluó la actividad antioxidante de unas 20 especies vegetales entre frutas y hierbas comestibles, sobresaliendo la actividad de *Solanum americanum* Miller (Cáceres et al., 2009; Caballeros, 2001; Lima, 2003).

F. Fichas técnicas de hongos comestibles a estudiar

1. ***Agaricus* aff. *bisporus*** (J.E. Lange) Imbach.

a) Aspectos generales

Especie de hongo basidiomiceto de la familia *Agaricales*, cultivado extensamente para su uso en gastronomía. Es la especie más frecuentemente empleada de las especies comestibles de hongos, prestándose a numerosas formas de consumo (Soeroes et al., 2005).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Homobasidiomycetes*

Orden: Agaricales

Familia: *Agaricaceae*

Género: *Agaricus*

Especie: *A. bisporus* (Soeroes et al., 2005).

c) Características macroscópicas

Píleo de forma semiesférica o plana y estípite cilíndrico, normalmente blanco, el cual mide de 5-12 cm de diámetro, inicialmente hemiesférico que luego pasa a plano-convexo. Cutícula blanca con fibrillas y escamas más oscuras, pasa a color cremoso en la madurez. Láminas desiguales, rosa al principio que pasan a marrón chocolate. Anillo en la parte superior que se desintegra fácilmente. Esporada marrón chocolate. Carne blanca con tonos rosados al corte, de sabor agradable y olor poco perceptible (Osorio & Grosso, 2005).

d) Hábitat y distribución

Habitan en tierras removidas o en orillas de caminos. En primavera y a veces en otoño. Industrialmente se ha cultivado en diversos medios, principalmente el estiércol natural, de los cuales el más idóneo es el de caballo, el de mula o el de asno. El estiércol ha de proceder de animales trabajados y que no coman forrajes frescos o alimentos verdes. Este estiércol debe estar compuesto a base de paja de trigo o de centeno. El cultivo conlleva una serie de parámetros específicos para la obtención del fruto deseado. Su distribución en el continente Asiático, China comprende cerca del 40% de la producción y consumo. Estados Unidos, Holanda, España, Francia y Polonia son los principales proveedores. En Argentina, Colombia y México ha crecido la demanda y la oferta de los consumidores modernos por alimentos con beneficios agregados para la salud (Kerrigan, Carvalho, Horgen & Anderson, 1995).

Guatemala produce actualmente cerca de 68,504 kg de *A. bisporus,* como producto de diversas empresas que se dedican a su producción industrial, localizadas tanto en Chimaltenango y en Atitlán. (León, 2003)

2. ***Armillariella polymyces*** (Pers.) Singer & Clémençon

a) Aspectos generales

Especies de hongos comestibles que son parásitas ya que atacan y pudren las raíces de los encinos, los almendros y los cítricos (Volk & Burdsall, 1995).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: *Agaricales*

Familia: Marasmiaceae

Género: *Armillariella*

Especie: *A. polymyces* (Volk & Burdsall, 1995).

c) Características macroscópicas

Píleo de 2-7 cm de diámetro, globoso, convexo; que va del color café-rosa a café-amarillento, liso a rugoso u ondulado con el margen estriado con restos escamosos blancos y caedizos. Tienen esporas blancas y un estípite unificado con el píleo. También están provistas de anillo (Volk & Burdsall, 1995).

d) Hábitat y distribución

Generalmente son especies asociadas a la madera tanto viva como muerta. Habitan en las raíces de encinos, almendros y cítricos que en algunos casos destruyen con asombrosa rapidez. Esta destrucción en muchas ocasiones es debida a la llamada podredumbre blanca de las raíces, provocada por la invasión del hongo de la *Armillariella*. Se observa que debajo de la corteza de las raíces aparece el micelio blanco (Volk & Burdsall, 1995).

En Guatemala *A. polymyces* se ha encontrado en el municipio de San Mateo Ixtatán, Huehuetenango, principalmente en bosques de *Pinus rudis* Lindl. de las comunidades de La Laguna y Tactic en el mes de octubre (Bran et al., 2003).

3. ***Amanita garabitoana*** Tulloss, Halling, & G. M. Muell

a) Aspectos generales

Amanita es un género de hongos basidiomicetos del orden Agaricales. Contiene alrededor de 600 especies de hongos, dentro de las cuales se encuentran las más conocidas para consumo humano y las de mayor toxicidad (Tullos & Zhu, 1998).

En estudios anteriores se logró un nuevo reporte para Guatemala: *A. garabitoana,* un hongo comestible que se clasifica popularmente como parte del grupo de los Hongos de San Juan. Anteriormente se había reportado como *Amanita calyptroderma, A. caesarea*-complex y *Amanita* sp. Sin embargo, recientemente fue descrita como especie nueva de Costa Rica, indicando su probable toxicidad. Taxonómicamente *A. garabitoana* se clasifica en la Sección

Vaginatae (Fr.) Quél., en contraste a las especies del complejo *A. caesareae,* las cuales pertenecen a la Sección *Caesareae* Sing., a pesar de ser similares morfológicamente (Bran et al., 2004).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Agaricomycetes*

Orden: *Agaricales*

Familia: *Pluteaceae*

Género: *Amanita*

Especie: *A. garabitoana* (Halling & Mueller, 2004).

c) Características macroscópicas

Píleo de 6 - 21.2 cm de diámetro, campanulado y fuertemente convexo con un centro ligeramente deprimido de color naranja pardo oliváceo a amarillo o marrón amarillento; sobre el centro a menudo con un círculo oscuro en el extremo interior de las estrías marginales. Su carne es de color blanco a amarillento obscuro. Estípite de 9-25 por 15 - 24 cm de alto, de color amarillo naranja a amarillo pálido, cilíndricos con una volva suave y membranosa blanca, casi siempre vinculado a sólo la base del tallo. Por debajo del anillo está decorada con escamas secas naranja opaco o marrón. El anillo es de color amarillo ligeramente verdoso. Las esporas están ampliamente distribuidas de manera elipsoide (Halling & Mueller, 2004).

d) Hábitat y distribución

Originalmente descrito de Costa Rica y Honduras. *A. garabitoana* es conocida en Costa Rica desde el norte de los bosques de *Quercus Brenesii* Trel. en Guanacaste hacia el sur de Seemanii en el centro de Talamanca (Halling & Mueller, 2004).

En un estudio realizado recientemente en Guatemala se muestrearon 14 localidades de 8 departamentos del país, principalmente en las zonas norte, occidente y centro, encontrando la especie de *A. garabitoana* en Nestón, Uspantán y San Lucas Sacatepéquez (Bran et al., 2004).

4. ***Boletus edulis*** Bull.

a) Aspectos generales

Este hongo es una de los más apreciados por su sabor y textura. El nombre latino del hongo indica esta característica: en latín *edulis* significa comestible (Thomas, 1993).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Homobasidiomycetes*

Orden: Boletales

Familia: *Boletaceae*

Género: *Boletus*

Especie: *B. edulis* (Thomas, 1993).

c) Características macroscópicas

Posee una forma muy característica similar a un tapón de cava. El píleo es de forma convexa. El color es muy variable, predominando el pardo, color calabaza, con el borde más claro; esta es una característica que lo distingue claramente de los otros boletos parecidos. Muy carnoso, se muestra ligeramente viscoso en tiempo de lluvias, después su consistencia es seca. Su forma va desde hemisférica a convexa, aplanándose en la vejez. Su tamaño es de 6 - 20 cm de diámetro y en ocasiones alcanza grandes dimensiones, hasta 30 cm. Sus tubos himenóforos son de color blanco cuando es joven, se vuelven amarillos con el tiempo y finalmente verdosos, son separables con facilidad del píleo y no llegan al estípite (libres). Poros con colores, se muestran inmutables tanto al tacto como al corte. El estípite es robusto, desnudo, lleno y duro de color generalmente blanco y a veces con una fina retícula en la parte superior. Su carne es blanca e inmutable al contacto con el aire, es dura cuando el ejemplar es joven y se vuelve más esponjosa con la edad, de olor fúngico agradable y sabor dulce con recuerdo a avellana (Thomas, 1993).

d) Hábitat y distribución

Es una especie adaptada a multitud de hábitats, ya que es una micorriza. Han sido encontrados en pinares, robledales, hayedos, abetales e incluso en jarales. Se encuentra de septiembre a noviembre en bosques de hayas, robles, castaños, abetos y pinos de montaña (Torricelli, Johansson & Wiithrich, 1997).

En Guatemala *B. edulis* se ha encontrado en Tactic, San Mateo, e Ixtactán Quetzaltenango (Argueta, 1983).

5. ***Cantharellus lateritius*** (Berk.) Singer

a) Aspectos generales

Himenóforo formado por lamelas, fácilmente separables del píleo y crece sobre materia orgánica en descomposición (Guevara, Garza & Cázares, 2004).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Agaricomycetes*

Orden: *Cantharellales*

Familia: *Cantharellaceae*

Género: *Cantharellus*

Especie: *C. lateritius* (Feibelman, Doudrick, Cibula & Bennett, 1997)

c) Características macroscópicas

Píleo de 3-10 cm de ancho; plano, liso, en forma de jarrón con un margen ondulado, brillante amarillo-naranja. Su interior es liso o con arrugas superficiales. El estípite es de 2-10 cm de largo y 2.5-5 cm de espesor; estrechándose hacia la base de color pálido. Su carne es blanca y suave (Feibelman et al., 1997).

d) Hábitat y distribución

Normalmente crece aislado o en grupo bajo frondosos árboles. Sus cuerpos fructíferos se observan en los meses de julio a octubre (Feibelman et al., 1997).

En Guatemala *C. lateritius* se localiza en la región central del país, principalmente en el municipio de San Raymundo (Bran et al., 2004).

6. ***Laccaria amethystina*** *(*Huds.) Cooke

a) Aspectos generales

Hongo que desarrolla su cuerpo fructífero teñido completamente de color violeta (Guerbi, Dalaruelle & Selosse, 1999).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycotina*

Clase: *Homobasidiomycetes*

Orden: Tricholomatales

Familia: *Tricholomataceae*

Género: *Laccaria*

Especie: *L. amethystina* (Guerbi et al., 1999).

c) Características macroscópicas

Píleo que puede llegar a los 5 cm de diámetro, de un llamativo color violeta. Es un poco higrófano, circunstancia que hace que al secarse su color palidezca al punto de volverse blanquecino. En su desarrollo pasa de convexo a plano, llegando incluso a deprimirse en la vejez, su borde está irregularmente lobulado. Láminas separadas entre sí. Estípite central y cilíndrico. Carne violeta, como el resto, bastante fibrosa y delgada, con olor fúngico suave y sabor dulce (Guerbi et al., 1999).

d) Hábitat y distribución:

Es una especie que sale en zonas musgosas y húmedas de los bosques, tanto bajo coníferas como planifolios, muchas veces en grandes grupos. Frecuente y abundante (Guerbi et al., 1999).

En Guatemala *L. amethystina* se ha encontrado en Comalapa, Tecpán, Patzún, Chichicastenango, Uspantán Quiché y Totonicapán (Argueta, 1983).

7. ***Lactarius deliciosus*** (L.) Gray

a) Aspectos generales

Esta especie está presente durante largo tiempo. También conocido como níscalo o mécula, seta roya, hongo royo (Guillot, Guiollant, Damez & Dusser, 1991).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycotina*

Clase: *Homobasidiomycetes*

Orden: Russulales

Familia: *Russulaceae*

Género: *Lactarius*

Especie: *L. deliciosus* (Guilliot et al., 1991).

c) Características macroscópicas

Se reconoce por el aspecto rígido, con el margen del píleo incurvado. Superficie de color anaranjado, el cual presenta manchas oscuras que le confieren el aspecto característico. Las laminillas son naranja-amarillas o naranja-marrones. El estípite es cilíndrico, relativamente corto de color naranja-amarillo, macizo, robusto, con hoyuelos y arrugas algo llamativas. La carne es blanquecina, al cortarla adquiere un color zanahoria por el látex que segrega. Tiene un sabor ligeramente amargo. El píleo puede medir hasta 14 cm. de diámetro mientras que el estípite es más corto (Guillot et al., 1991).

d) Hábitat y distribución

Se asocia con las raíces de los pinos formando ectomicorizas en terrenos con abundantes matorrales como biércol, gayuba, estepas, ginebros, hierbas turmeras, etc., también en terrenos cubiertos de hojarasca (Guillot et al., 1991).

En Guatemala *L. deliciosus* se ha encontrado en San Martín Jilotepeque, Tecpán, Chimaltenango; Tactic, Cobán, Comalapa, Patzún, Chichicastenango, Uspantán, San Juan Sacatepéquez, San Mateo Ixtatán, San Rafaél La Independencia y Totonicapán (Argueta, 1983).

8. ***Neolentinus ponderosus*** (O.K. Mill.) Redhead & Ginns

a) Aspectos generales

Especie que con frecuencia crece en la base de pinos muertos. Desde que *N. ponderosus* es causante de la descompoción de la madera de los pinos, se ha retirado del género de hongos Lentinues (Gilbertson, 1974).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: Polyporales

Familia: *Polyporaceae*

Género: *Neolentinus*

Especie: *N*. *ponderosus* (Mahler, 2006).

c) Características macroscópicas

Píleo entre 7-30 cm de diámetro. Convexo al inicio hasta convertirse en plano-convexo con el margen enrollado. Superficie seca a menudo con un tipo de escamas grandes de color marron. Estípite de 6-16 cm de largo y de 2.5-7.0 cm de espesor, sólido y resistente. La superficie de la punta es acanalada de los bordes de color crema (Redhead & Ginns, 1985).

d) Hábitat y distribución

Mundialmente algunas especies de *Neolentinus,* son de amplia distribución. *N. ponderosus,* es una especie que se encuentra en la región Pacífico-Noroeste de América del Norte, también se ha reportado en México en temporada seca (35,39). Se encuentra sobre troncos podridos de coníferas (Mahler, 2006).

En Guatemala, *N. ponderosus* se encuentra en el municipio de San Mateo Ixtatán, Huehuetenango sobre troncos de *Pinus* spp. (Bran et al., 2003).

9. ***Pleurotus ostreatus*** (Jacq.) P. Kumm.

a) Aspectos generales

Es un hongo comestible, que se consume ampliamente por su sabor y la facilidad de su identificación. El champiñón ostra es uno de los hongos silvestres más codiciados, aunque también pueden ser cultivados sobre paja y otros sustratos. Con frecuencia presentan un aroma a anís debido a la presencia de benzaldehído (García, 1982).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Homobasidiomycetes*

Orden: Agaricales

Familia: *Pleurotaceae*

Género: *Pleurotus*

Especie: *P.ostreatus* (García, 1982).

c) Características macroscópicas:

Píleo entre 5-15 cm, aunque en ocasiones alcanza dimensiones mucho mayores. Liso, convexo a plano, con forma de ostra. De color muy variable, desde gris claro hasta marrón oscuro, algunas veces con reflejos azulados. Margen delgado y enrollado del mismo color que el píleo. Sus láminas son de color blancas a cremas cuando los ejemplares son maduros. El estípite es muy corto, a veces ausente, por lo que el píleo se inserta directamente en el sustrato. La carne es blanca y posee olor y sabor agradable (García, 1982).

d) Hábitat y distribución

Esta especie se desarrolla casi siempre en troncos en fase de descomposición, aunque a veces puede comportarse como parásita en robles, chopos, olmos, etc. (García, 1982). En Guatemala *P. ostreatus* se ha encontrado en el municipio de Mixco de la ciudad de Guatemala, Zaragoza, Chimaltenango y en Atitlán, Sololá (Argueta, 1983).

10. ***Agaricus brunnescens*** Peck

a) Aspectos generales

Especie de hongo basidiomiceto de la familia *Agaricales,* son de la misma familia que el champiñón blanco (*A. bisporus*) pero ofrece una textura más firme y tersa, un sabor más dulce, fresco y delicado (Soeroes et. al., 2005).

b) Clasificación

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Homobasidiomycetes*

Orden: Agaricales

Familia: *Agaricaceae*

Género: *Agaricus*

Especie: *A. brunnescens* (Soeroes et. al., 2005).

c) Características macroscópicas:

Píleo entre 5 - 10 cm, blanco, globular o semiesférico, luego convexo e incluso totalmente extendido. Láminas de color rosado pálido. Estípite de 3 – 5 x 1 – 1.5 cm blanco. Esporas de 6 – 9 x 4 – 6 mm de color pardo oscuro, lisas, elípticas, depósito marrón chocolate. Basidia con dos esporas (Osorio & Grosso, 2005).

d) Hábitat y distribución

Su hábitat son tierras ricas en materia orgánica. Su distribución se encuentra desde Asia, China, Estados Unidos, Holanda, España, Francia y Polonia. (Richard, et al., 1995). En Guatemala se produce a nivel industrial en Chimaltenango y en Atitlán (León, 2003).

IV. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha determinado que muchas enfermedades pueden ser provocadas por radicales libres, sustancias que tienen la capacidad de causar reacciones oxidativas en el organismo y desencadenar enfermedades metabólicas, infecciosas, neurodegenerativas y cardiovasculares. Debido a esto, es indispensable la investigación de propiedades antioxidantes en productos naturales los cuales presentan menor toxicidad en relación a los compuestos sintéticos utilizados actualmente como aditivos alimenticios (Imark et al., 2001).

En muchos países el consumo de hongos es utilizado tradicionalmente como una alternativa alimenticia. Estos poseen diversas propiedades nutricionales y se pueden obtener mediante técnicas sencillas de bajo costo, y además sus diferentes componentes han presentado actividades antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorias y antioxidantes (Sommerkamp, 1990).

Las especies de basidiomicetos comestibles se incluyeron en este estudio debido a su disponibilidad, todas poseen un elevado potencial de comercialización en los mercados nacionales y su consumo puede contribuir a la economía del país (Sommerkamp, 1990).

Es importante mencionar que en estudios previos realizados en otros países se ha logrado demostrar la actividad antioxidante que presentan diversas especies de basidiomicetos comestibles (Jayakumar et al., 2006; Tsai et al., 2006; Heleno et al., 2010; Elmastas et al., 2007; Ferreira et al., 2007).

Actualmente en Guatemala no se han documentado estudios que evalúen la actividad antioxidante de basidiomicetos comestibles, por este motivo con el presente estudio se pretende evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de las diez especies de basidiomicetos mencionadas anteriormente; mediante diversas metodologías.

V. OBJETIVOS

A. General

Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de diez basidiomicetos comestibles en Guatemala.

B. Específicos

1. Comparar la actividad antioxidante entre extractos etanólicos y acuosos de las diez especies de basidiomicetos comestibles de Guatemala.
2. Identificar la especie de basidiomicetos con la mayor actividad antioxidante.

VI. HIPÓTESIS

De los diez hongos basidiomicetos investigados, al menos uno de los extractos presenta alguna actividad antioxidante.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo y muestra

El universo de trabajo estuvo conformado por los basidiomicetos comestibles en Guatemala. La muestra estuvo constituida por los extractos etanólicos y acuosos de diez basidiomicetos comestibles, escogidos en base a criterios de disponibilidad del material fúngico, su potencial comercial en los mercados nacionales, la inexistencia de estudios previos en Guatemala a cerca de su capacidad antioxidante y que por su uso o referencia podrían tener una actividad antioxidante. Las especies que se utilizaron fueron: *A.bisporus, A. brunnescens, A. garabitoana, A. polymyces, B. edulis, C. lateritius, L. amethystina, L. deliciosus, N. ponderosus* y *P. ostreatus.*

B. Obtención e identificación taxonómica del material fúngico

Cinco extractos etanólicos al 95% fueron proporcionados por la Unidad de Bioensayos del Departamento de Citohistología estos fueron: *A. garabitoana, A. polymyces, B. edulis, L. deliciosus y N. ponderosus.* Con respecto al resto de los basidiomicetos, el cuerpo fructífero fue adquirido comercialmente para una posterior desecación y obtención del extracto, a estos basidiomicetos se les realizó la identificación taxonómica con la colaboración del Licenciado Roberto Cáceres, en la Micoteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

C. Métodos

1. Desecación de hongos (Paz et al., 2011)

a). Equipo

Desecadora de focos para hongos

Congelador a -20° C

Balanza analítica

Lector de humedad

b) Materiales

Bisturí

Bolsas de polipapel

Papel encerado

Latas para almacenamiento

c) Procedimiento

i. Desecación de basidiomicetos comestibles.

– Pesar hongos frescos en balanza analítica.

– Cortar hongos transversalmente con un bisturí.

– Colocar los fragmentos cortados dentro de la desecadora, sin sobreponerlos.

– Dejar secando durante 72 horas (no quemarlos).

– Pesar en balanza analítica y determinar el porcentaje de humedad de los hongos secos en el lector de humedad. La humedad deberá ser menor del 10% caso contrario secar nuevamente.

– Determinar el porcentaje de rendimiento:

% rendimiento = (peso hongos secos/peso hongos frescos) x 100.

– Guardar hongos secos en bolsas de polipapel.

ii. Conservación de los hongos secos

– Colocar bolsa conteniendo los hongos secos en un congelador a -20°C.

– Congelar por 2 semanas y luego retirar del congelador.

– Secar nuevamente por 72 horas dentro de la desecadora.

– Pesar en balanza analítica y determinar el porcentaje de humedad de los hongos secos en el lector de humedad La humedad deberá ser menor del 10% caso contrario secar nuevamente.

– Guardar los hongos dentro de la bolsa y ésta última guardarla dentro de una lata, la cual se cerrará y almacenará en un lugar fresco, sin luz solar directa.

2. Obtención de extractos etanólicos por la técnica de percolación (Paz et al., 2011)

a) Material y equipo

Percolador de vidrio o de acero inoxidable.

Balanza analítica

Algodón

Papel filtro

Vasos de precipitación

Erlenmeyers

Balón aforado

Termómetro

Rotavapor

Etanol al 95%

b) Procedimiento

- Pesar la cantidad de sustrato fúngico a utilizar, dependiendo de la capacidad del percolador.
- Humedecer el sustrato con disolvente adecuado para la extracción utilizando el vaso de precipitación.
- Colocar papel filtro y algodón en la parte inferior del percolador previamente limpio y seco.
- Transferir el sustrato al percolador y agregar por cada 100 gramos de material fúngico 1000 ml de etanol al 95% a manera de cubrir todo el material fúngico.
- Dejar reposar el tiempo necesario para que se lleve a cabo la extracción.
- Abrir la llave inferior del percolador y dejar gotear a una velocidad moderada, recolectando el líquido en un Erlenmeyer.
- Añadir disolvente extra, hasta recolectar en el Erlenmeyer la cantidad de disolvente agregada al inicio.
- Presionar fuertemente el material sólido que quedó en el percolador.
- Colocar todo el líquido obtenido dentro de un balón aforado y éste colocarlo en un rotavapor. Encender el baño de María y llevar la temperatura a 40±1°C.
- Engrasar con silicón todas las partes esmeriladas y armar el rotavapor según el instructivo específico.
- Succionar la solución obtenida del percolador.
- Conectar la bomba de vacío y el rotavapor, e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente (etanol al 95%) hasta llevar a la consistencia semisólida.
- Verter el extracto concentrado en un cristalizador de vidrio debidamente tarado y rotulado.
- Colocar en una desecadora durante 7-15 días.
- Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente tarados y rotulados.

– Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C.

3. Obtención de extractos acuosos por la técnica de infusión (Carmona, López, González & Muñoz, 2006; Mazariegos, 2009).

a) Material y equipo

Balanza analítica
Estufa
Beacker
Agua desmineralizada
Liofilizador
Refrigeradora
Recipientes del liofilizador
Papel flitro
Embudo

b) Procedimiento

– Medir 100 mL de agua desmineralizada en un beacker y llevarla a ebullición.
– Pesar la cantidad de sustrato fúngico a utilizar. Por cada 10 gramos, 100 mL de agua.
– Al llegar el agua a punto de ebullición, introducir y dejar reposar el material fúngico en el agua caliente.
– Dejar enfriar, filtrar la solución y colocar en frascos del liofilizador.
– Congelar el extracto resultante para posterior liofilización.

4. Evaluación de la actividad antioxidante

a) Método macrométrico de determinación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (Lock, 1998; Lima, 2003)

i. Material y equipo

– Cristalería

16 tubos de ensayo con capacidad de 10 mL
3 frascos de vidrio color ámbar y tapón de rosca; uno con capacidad de 25 a 50 mL y dos con capacidad de 100 a 250 mL.

2 balones aforados de 10 mL y 100 mL respectivamente.

– Materiales

1 pipeta automática de 20 a 200 µL

1 pipeta automática de 100 a 1000 µL

– Reactivos

6.4 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu

12.8 mL de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 10% p/v.

1.7 mL ácido gálico ($C_7H_6O_5$) en solución 1 mg/mL.

64 mL de agua desmineralizada

– Equipo

Espectrofotómetro

Potenciómetro o pHmetro

Vórtex

Balanza analítica

ii. Procedimiento

– Preparación de soluciones

1. Solución de Carbonato de Sodio anhidro (Na_2CO_3) al 10% p/v

Pesar en balanza analítica 10 g de carbonato de sodio anhidro y disolver en 100 ml de agua desmineralizada. Agitar la solución y conservar en recipiente color ámbar.

2. Solución de ácido gálico anhidro ($C_7H_6O_5$) 1 mg/mL

Se pesan 8 mg de ácido gálico anhidro y se disuelve en 8 mL de agua desmineralizada. Diluir 1:10 (1 mL de solución de ácido gálico 1 mg/mL en 9 mL de agua). Conservar en frasco de color ámbar.

Preparación de los tubos de reacción y curva de lectura.

Utilizar tubos de vidrio de 10 mL. Preparar una serie de tubos que contienen los siguientes reactivos:

	H_2O (mL)	Ácido gálico (µL) solución 1µg/10µL	Reactivo de Folin-Ciocalteu (mL)	Na_2CO_3 10% (mL)
Blanco	4.000	0	0.4	0.8
Patrón 1	3.975	25	0.4	0.8
Patrón 2	3.950	50	0.4	0.8
Patrón 3	3.900	100	0.4	0.8
Patrón 4	3.850	150	0.4	0.8
Patrón 5	3.800	200	0.4	0.8
Patrón 6	3.750	250	0.4	0.8
Muestra 1a	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 1b	3.900	100	0.4	0.8

- A todos los tubos agregar 0.4 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 0.8 mL de Na_2CO_3 10%. Agitar los tubos en vortex durante 30 segundos, luego incubar en baño maría a temperatura de 90-100° C durante 1 minuto. Dejar enfriar y luego leer absorbancia a 765 nm. Realizar ensayo por triplicado.

iii. Registro de resultados de la curva y cálculo de la concentración de fenoles expresado en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso.

- Medir absorbancia 1, 2 y 3 de cada tubo, luego realizar un promedio.
- Colocar en la tabla la concentración en µg (equivalentes de ácido gálico).
- Luego realizar la regresión lineal de los datos de la curva de calibración graficando en el eje de las abscisas (y) el promedio de las absorbancias y en el eje de las ordenadas (x) la concentración en µg equivalentes de ácido gálico.
- Calcular la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la línea recta despejando "x".
- El resultado así obtenido se utiliza para calcular los µg equivalentes de ácido gálico / mg peso seco. El cálculo se realiza de la siguiente forma:

$$\text{µg eq. de ácido gálico/mg peso seco} = \frac{\text{resultado de la ecuación de la recta (µg)}}{\text{volumen medido (ml)} * \frac{\text{g peso seco}}{\text{ml extracto}} * \frac{1000\ \text{mg}}{1\text{g}}}$$

b) Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (Lock, 1998)

i. Material y equipo

- cromatoplaca de silicagel $60F_{254}$

– cámara de vidrio
– asperjador
– acetato de etilo
– ácido acético
– ácido fórmico
– agua desmineralizada
– DPPH 1 mg/mL
– Metanol
– Terbutilhidroquinona (TBHQ)
– Rutina
– Quercetina
– Vitamina C
– Vitamina E
– Trolox

ii. Procedimiento:

Aplicar 10 µL de muestra y 5 µL del estándar antioxidante TBHQ, rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox en la cromatoplaca de silicagel 60F254.

Colocar la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).

Secar y asperjar con DPPH (1 mg/mL en metanol).

Detección: Si los extractos presentan actividad antioxidante se observa la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

c) Actividad antioxidante total mediante el reactivo de DPPH (Sharma & Bhat, 2009; Lima, 2003; Caballeros, 2001; Córdova, 2009)

i. Material y equipo

– Cristalería

17 tubos de ensayo con capacidad de 10 ml

1 balón volumétrico de 100 ml

5 frascos de vidrio color ámbar con tapadera de rosca. Dos de capacidad de 25 a 50 ml y 3 con capacidad de 100 a 250 ml.

– Materiales

1 pipeta automática de 20 a 200 µl

1 pipeta automática de 100 a 1000 µl

1 gradilla para tubos

– Reactivos

0.0021 g de reactivo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

1ml de ácido acético 0.2 M

19 ml de acetato de sodio 0,2 M

37 ml de metanol grado reactivo

60 g de NaOH

500 ml de agua desmineralizada

– Equipo

Espectrofotómetro

Potenciómetro o pHmetro

Vortex

Balanza analítica con 5 decimales.

ii. Procedimiento

1. Preparación de las soluciones

– Solución de DPPH 500 µM en metanol.

Pesar 10.95 mg de reactivo de DPPH y disolver en 50 ml de metanol. La solución se agita y se conserva en un recipiente color ámbar. Preparar el mismo día que será utilizado.

– Amortiguador de acetato

Preparar una solución acuosa de acetato de sodio 0.2 M de la siguiente forma: pesar 1.6406 g de acetato de sodio anhidro y diluir con 100 mL de agua desmineralizada. Preparar una solución de ácido acético 0.2M con 1.201 g de ácido acético al 96% en 100 mL de agua desmineralizada.

Preparar el amortiguador con: 1 mL de ácido acético 0.2M y 19 ml de acetato de sodio 0.2 M; llevar a pH 6.0 mediante NaOH 6N (prepararlo disolviendo 24 g de NaOH en 100 ml de agua desmineralizada).

2. Preparación de los tubos de reacción

En tubos de vidrio recubiertos con papel de aluminio preparar de la siguiente forma:

Reactivo	Blanco Control	Control	Blanco de ensayo	Ensayo
Buffer de acetatos	1ml	1ml	1ml	1ml
Metanol	2ml	1.5ml	1.9ml	1.4ml
Solución de DPPH	------	0.5ml	------	0.5ml
Dilución de cada muestra	------	-----	0.1ml	0.1ml

Los tubos preparados agitarlos en un vortex durante 30 segundos e incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se debe leer absorbancias de cada uno a una longitud de onda de 517 nm. Siempre se debe leer la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo. Realizar los ensayos por triplicado.

3. Preparación de la curva de lectura

Realizar una serie de diluciones del extracto con metanol de la siguiente forma: diluciones 1:5, 2:3, 3:2, 4:1 y 5:0.

Las mediciones de cada dilución se realizan siguiendo el paso de la preparación de tubos de reacción. Cada dilución corresponde a una muestra. Realizar los ensayos de las diluciones por triplicado.

Registro de los resultados de la curva y cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia: se lee dos veces la absorbancia, de las cuales se calcula el promedio y el porcentaje de inhibición de la concentración. Calculándolo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control- absorbancia de la dilución} * 100}{\text{Absorbancia del control}} = \%$$

4. Cálculo de la concentración de la materia seca fúngica.

Debe determinarse el peso del hongo freso, peso seco y el volumen final del extracto obtenido. Luego determinar la concentración de la materia prima seca utilizando la fórmula.

$$\frac{\text{Peso en fresco} * \text{Peso seco}}{\text{Volumen final}} = \text{g/ml} * 100\ \text{mg/ml} = \text{mg/ml}$$

5. Cálculo de la concentración de inhibición al 50% (CI_{50})

Los datos utilizados para el cálculo de la regresión lineal son: dilución, porcentaje de inhibición de la concentración y concentración de materia seca fúngica. Determinar la concentración por medio de regresión lineal.

d) Capacidad antioxidante por el método ABTS (Re, et al., 1999; Vasco, 2008)

i. Materiales y equipo

Material

Pipetas volumétricas

Vasos de precipitar

Probeta

Reactivos

Etanol absoluto

Trolox

Persulfato potásico

ii. Procedimiento

La obtención del radical se realiza a través de la reacción de ABTS 7 mM (38.41 mg en 10 mL de agua) con persulfato potásico 2.45 mM (3.31 mg en 5 mL de agua) incubados a temperatura ambiente (25°C) y en la oscuridad durante 16 horas. Ya formado el radical $ABTS^{+}$ diluir con etanol absoluto hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70±0.02 a una longitud de máxima absorción de 754 nm.

Incubar la solución de $ABTS^{+}$ y la serie de diluciones del extracto a 30°C durante 30 min. Antes de mezclarlos

- Incubar la solución de $ABTS^{+}$ y la serie de diluciones del extracto a 30°C durante 30 min.
- Preparación de los tubos de reacción: proteger los tubos de la luz con papel aluminio, preparar una serie de tubos de la siguiente forma: Control (3 mL de solución de $ABTS^{+}$) y Ensayo (3 mL de solución de $ABTS^{+}$ y 30 µL). Preparar los tubos de reacción por cada dilución por triplicado.
- Medir la absorbancia del blanco y del extracto al minuto 1, al minuto 4 y al minuto 6. A una longitud de 754 nm.

- Para calcular el % de inhibición de la concentración se emplea la fórmula.

$$\frac{\text{Abs control} - \text{Abs de la dilución}}{\text{Abs control}} * 100 = \% \text{ de Inhibición}$$

- Graficar los datos de % inhibición (eje Y) y concentración del extracto (eje X). Realizar una regresión lineal para determinar la ecuación de la recta y el r^2 (0.97 y 0.99).
- Con ello calcular el CI_{50} que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de la absorbancia de la solución de $ABTS^+$. Calculandolo con la ecuación de la recta así:

$$CI_{50} = (50\text{-pendiente})/\text{Intercepto}$$

- Para conocer la capacidad antioxidante de los extractos se debe elaborar curvas estándar de antioxidante sintético de referencia (Trolox, vitamina E, etc.)
- El antioxidante sintético de referencia, Trolox se deberá ensayar a una concentración de 0 – 15 µM (concentración final) en etanol, bajo las mismas condiciones.
- Para las curvas se debe calcular la regresión lineal y obtener de esa forma las ecuaciones. Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).
- La TEAC de un extracto representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto.

Los valores de TEAC se determinan como sigue:

$$\Delta A_{trolox} = (A_{T=0\ Trolox} - A_{T=6\ Trolox}) - \Delta A_{solvent(0\text{-}6\ min)}$$

$$\Delta A_{trolox} = m \cdot [Trolox]$$

$$TEAC_{extracto} = (\Delta A_{extracto}/m) \cdot d$$

Donde ΔA = reducción de la absorbancia, A=absorbancia al tiempo dado, m=pendiente de la curva estándar, [Trolox]= concentración de trolox, d= factor de dilución.

D. Diseño de la investigación

1. Tipo de Estudio

Se realizó un estudio experimental inferencial de tipo dosis-respuesta.

2. Variables

a) Independientes:

1. Las diez especies de basidiomicetos comestibles.
2. Extractos acuosos y etanólicos de los basidiomicetos comestibles.
3. Concentraciones de cada extracto.

b) Dependientes:

1. Actividad antioxidante detectada por medio de los ensayos macrométricos DPPH, ABTS y cuantificación de fenoles.

3. Validez de los métodos

Se realizaron curvas estándar de antioxidantes sintéticos de referencia como Trolox, vitamina E, ácido gálico y ácido ascórbico.

E. Análisis estadístico

Se realizaron tres réplicas por extracto obtenido de cada especie (diez extractos etanólicos y diez extractos acuosos) así como de los estándares utilizando los siguientes ensayos: Cuantificación de fenoles totales, determinación de actividad antioxidante por DPPH y ABTS. Para la cuantificación de fenoles totales se reporta el promedio de las tres cuantificaciones y su respectiva desviación estándar. Para las técnicas de DPPH y ABTS se calculó la ecuación de la recta y se evaluó estadísticamente con el coeficiente de determinación (r^2). Todas las mediciones se representaron en diagramas de dispersión para determinar gráficamente la tendencia de los datos. Se obtuvo un comportamiento lineal con el que se realizó un análisis de regresión lineal (simple). Para cada extracto, se calculó el valor de concentración Inhibitoria CI_{50} con un intervalo de confianza del 95%.

VIII. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante en extractos etanólicos y acuosos de diez especies de basidiomicetos comestibles. Las especies incluidas se listan en el Cuadro 1, con el nombre científico, nombre común y su distribución en Guatemala también se incluyen los porcentajes de rendimiento obtenidos en la preparación de extractos acuosos y etanólicos de cada especie.

Cuadro 1. Aspectos importantes de las diez especies de Basidiomicetos comestibles de Guatemala

Nombre científico	Nombre común	Distribución en Guatemala	Porcentaje de Rendimiento	
			Etanólico	Acuoso
Armillariella polymyces (Pers.) Singer & Clémençon	Silip	San Mateo Ixtatán y Tiaktak, Huehuetenango	07%	10%
Amanita garabitoana Tulloss, Halling, & G. M. Muell	Hongo macho	Nestón, Uspantán, Quiché y San Lucas Sacatepequez	16%	11%
Boletus edulis Bull	Pancita, hongo blanco.	Tactic, San Mateo Ixtatán, Quetzaltenango	17%	08%
Neolentinus ponderosus (O.K. Mill.) Redhead. & Ginns	Kuculich u hongo de verano	San Mateo Ixtatán, Quetzaltenango	19%	13%
Lactarius deliciosus (L.) Gray	Sarah o Cabeza de Sahara	San Martín Jilotepeque, Chimaltenango y Uspantán, Quiché	12%	09%
Agaricus bisporus (J.E. Lange) Imbach	Champiñón o Seta de Paris	Chimaltenango, Atitlán, Sololá	28%	07%
Laccaria amethystina (Huds.) Cooke	Pimpinela morada	Chichicastenango y Uspantán Quiché	07%	12%
Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.	Hongo ostra	Mixco, Guatemala	11%	07%
Cantharellus lateritius (Berk.) Singer	Anacate o Cantarula	San Raymundo, Guatemala	03%	05%
Agaricus brunnescens Peck	Portobello o Criminí	Chimaltenango y Atitlán, Sololá	23%	13%

Fuente: Bran et al., (2003), Paz et al., (2007), Rodríguez et al., (2009)
Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT.

A cada extracto de las especies estudiadas se le realizó un tamizaje de actividad antioxidante utilizando la técnica de CCF, empleando DPPH como revelador. El resultado obtenido fue positivo en todos los extractos (Cuadro 2, Anexos 6 y 7).

Cuadro 2. Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina

Especie	Extracto	Actividad Antioxidante	Resultado
Armillariella polymyces	Etanólico	++	Positivo
	Acuoso	++	Positivo
Amanita garabitoana	Etanólico	+++	Positivo
	Acuoso	++++	Positivo
Boletus edulis	Etanólico	++++	Positivo
	Acuoso	++++	Positivo
Neolentinus ponderosus	Etanólico	+++	Positivo
	Acuoso	++	Positivo
Lactarius deliciosus	Etanólico	+++	Positivo
	Acuoso	++++	Positivo
Agaricus bisporus	Etanólico	++++	Positivo
	Acuoso	++++	Positivo
Laccaria amethystina	Etanólico	+++	Positivo
	Acuoso	++	Positivo
Pleurotus ostreatus	Etanólico	++	Positivo
	Acuoso	++	Positivo
Cantharellus lateritius	Etanólico	++	Positivo
	Acuoso	++	Positivo
Agaricus brunnescens	Etanólico	++++	Positivo
	Acuoso	+++	Positivo
TBHQ	Estándares	+++	Positivo
Rutina		++++	Positivo
β-Caroteno		+	Positivo
Quercetina		+++	Positivo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT
Fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial-agua (50:5.5:5.5:13.5)
Revelador: Reactivo DPPH.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de cuantificación de fenoles totales realizada por el método macrométrico de Folin-Ciocalteu (Anexo 10), se utilizó ácido gálico como estándar (Gráfica 1).

Cuadro 3. Cuantificación de fenoles totales por medio de reactivo de Folin-Ciocalteu.

Especie	Extracto	Peso (g)	Concentración (mg/mL)	µg eq. ácido gálico /mg de extracto*
Armillariella polymyces	Etanólico	0.201	20	06.75 ± 01.24
	Acuoso	0.106	6	12.10 ± 00.41
Amanita garabitoana	Etanólico	0.198	12	27.11 ± 01.49
	Acuoso	0.110	2	84.98 ± 04.81
Boletus edulis	Etanólico	0.204	4	42.70 ± 03.48
	Acuoso	0.102	1	93.46 ± 18.17
Neolentinus ponderosus	Etanólico	0.201	20	12.80 ± 00.91
	Acuoso	0.100	8	47.82 ± 00.64
Lactarius deliciosus	Etanólico	0.205	20	11.14 ± 00.92
	Acuoso	0.105	6	50.46 ± 02.97
Agaricus bisporus	Etanólico	0.210	16	11.86 ± 01.07
	Acuoso	0.112	4	62.92 ± 00.71
Laccaria amethystina	Etanólico	0.202	8	09.42 ± 01.73
	Acuoso	0.101	4	36.48 ± 06.93
Pleurotus ostreatus	Etanólico	0.200	20	06.15 ± 01.14
	Acuoso	0.106	6	43.32 ± 01.53
Cantharellus lateritius	Etanólico	0.205	20	05.44 ± 00.08
	Acuoso	0.100	8	10.87 ± 00.46
Agaricus brunnescens	Etanólico	0.201	20	14.03 ± 00.76
	Acuoso	0.100	6	50.02 ± 02.07

Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT. * Promedio ± desviación estándar

En el Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos por medio de la técnica de reducción del DPPH (Anexo 11), con este método se determinó la actividad antioxidante de compuestos polares. Mientras que con el método macrométrico ABTS (Anexo 12) se determina la actividad antioxidante de compuestos con características más apolares (Cuadro 5). En los resultados se muestra la concentración de inhibición al 50% (CI_{50}) con el intervalo de confianza al 95% y los estándares de referencia. En el Cuadro 5 se reporta la capacidad antioxidante equivalente a Trolox de cada extracto; mientras que en el Cuadro 6 se presenta un consolidado de los resultados obtenidos con todas las técnicas. En las Gráficas 3 y 4 se comparan los resultados de los extractos etanólicos y acuosos obtenidos por medio de los métodos DPPH y ABTS.

Cuadro 4. Determinación de la actividad antioxidante por medio de la reducción del radical libre DPPH.

Especie	Extracto	Peso (g)	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	Determinación de actividad antioxidante expresado como CI_{50} (mg/mL)*
Armillariella polymyces	Etanólico	0.201	20	60.02	18.04 (15.12 - 21.63)
	Acuoso	0.106	6	64.98	04.80 (03.95 - 05.80)
Amanita garabitoana	Etanólico	0.198	12	64.38	09.70 (06.84 - 13.51)
	Acuoso	0.102	1.6	69.01	01.18 (01.07 - 01.29)
Boletus edulis	Etanólico	0.204	3.2	60.55	02.75 (02.46 - 03.07)
	Acuoso	0.102	1.6	69.01	00.93 (00.65 - 01.28)
Neolentinus ponderosus	Etanólico	0.201	20	60.59	16.10 (14.03 - 18.51)
	Acuoso	0.100	8	60.09	06.56 (06.17 - 06.97)
Lactarius deliciosus	Etanólico	0.205	20	60.68	17.04 (13.82 - 21.12)
	Acuoso	0.105	4	61.00	02.10 (01.78 - 02.95)
Agaricus bisporus	Etanólico	0.210	16	63.96	12.94 (11.40 - 14.70)
	Acuoso	0.112	6	70.75	02.45 (02.00 - 02.94)
Laccaria amethystina	Etanólico	0.202	20	61.93	17.24 (15.03 - 19.82)
	Acuoso	0.101	6	66.43	04.55 (03.61- 05.69)
Pleurotus ostreatus	Etanólico	0.200	20	51.57	19.86 (16.81 - 23.59)
	Acuoso	0.106	6	65.56	04.79 (03.41- 06.61)
Cantharellus lateritius	Etanólico	0.205	20	45.97	21.75 (19.73 - 24.13)
	Acuoso	0.100	8	60.00	06.80 (06.22 - 07.44)
Agaricus brunnescens	Etanólico	0.201	3.6	63.00	02.61 (01.87 - 03.25)
	Acuoso	0.100	6	65.59	03.91 (02.97- 05.05)
TROLOX	Estándares	0.01	0.20	60.25	0.171 (0.137- 0.203)
Vitamina C		0.2	0.16	67.40	0.128 (0.099 - 0.175)
Vitamina E		0.011	0.40	65.45	0.279 (0.233 - 0.322)
Quercetina[a]		0.010	0.05	65.37	0.041
Rutina[a]		0.106	0.24	65.57	0.189
TBHQ[a]		0.010	0.16	68.71	0.120

Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT

*Intervalo de confianza al 95%. [a] Marroquín; (2011).

Cuadro 5: Determinación de la actividad antioxidante por medio de reactivo de ABTS.

Especie	Extracto	Peso (g)	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	Determinación de actividad antioxidante expresado como CI_{50} (mg/mL)*	Capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) (µmol/g extracto)
Armillariella polymyces	Etanólico	0.4008	20	49.2	20.32 (16.23 – 23.01)	03.90
	Acuoso	0.2000	06	66.33	04.32 (03.26 – 05.65)	15.51
Amanita garabitoana	Etanólico	0.4004	20	67.56	14.45 (12.29 – 17.01)	04.66
	Acuoso	0.2002	06	67.98	02.86 (02.29 – 03.56)	15.99
Boletus edulis	Etanólico	0.4032	08	63.11	04.13 (02.67 – 05.88)	09.15
	Acuoso	0.2002	02	61.86	00.96 (00.63 – 01.35)	22.37
Neolentinus ponderosus	Etanólico	0.4013	20	57.01	17.21 (15.07 – 19.70)	04.00
	Acuoso[a]	0.2013	08	58.90	04.06 (03.24 – 05.86)	14.98
Lactarius deliciosus	Etanólico	0.4025	20	68.72	10.59 (08.84 – 12.64)	05.91
	Acuoso	0.2002	06	68.59	03.89 (03.41 – 04.47)	15.63
Agaricus bisporus	Etanólico	0.4020	20	59.61	15.38 (13.49 – 17.56)	04.71
	Acuoso	0.2019	06	63.91	03.85 (03.15 – 04.65)	15.96
Laccaria amethystina	Etanólico	0.4010	20	52.59	18.48 (16.26 – 21.08)	04.26
	Acuoso	0.1998	06	65.91	04.22 (03.83 – 04.64)	14.83
Pleurotus ostreatus	Etanólico	0.4021	20	45.95	23.81 (22.61 – 26.21)	03.89
	Acuoso	0.2004	06	68.71	03.95 (03.42 – 04.60)	15.29
Cantharellus lateritius	Etanólico	0.4210	20	50.99	20.27 (17.57 – 23.49)	03.91
	Acuoso	0.2002	08	59.42	06.17 (05.53 – 06.90)	11.70
Agaricus brunnescens	Etanólico	0.4002	12	70.79	07.08 (05.82 – 08.52)	08.24
	Acuoso	0.2004	06	66.71	03.72 (02.86 – 04.74)	18.26
TROLOX	Estándares	0.010	0.24	63.55	0.190 (0.121 – 0.255)	NA
Vitamina C		0.010	0.02	61.13	0.016 (0.010 – 0.023)	NA
Vitamina E		0.021	0.50	59.96	0.384 (0.327 – 0.415)	NA
Quercetina[b]		0.010	0.14	61.64	0.113	NA
Rutina[b]		0.040	0.80	67.80	0.423	NA
TBHQ[b]		0.100	0.48	60.59	0.396	NA

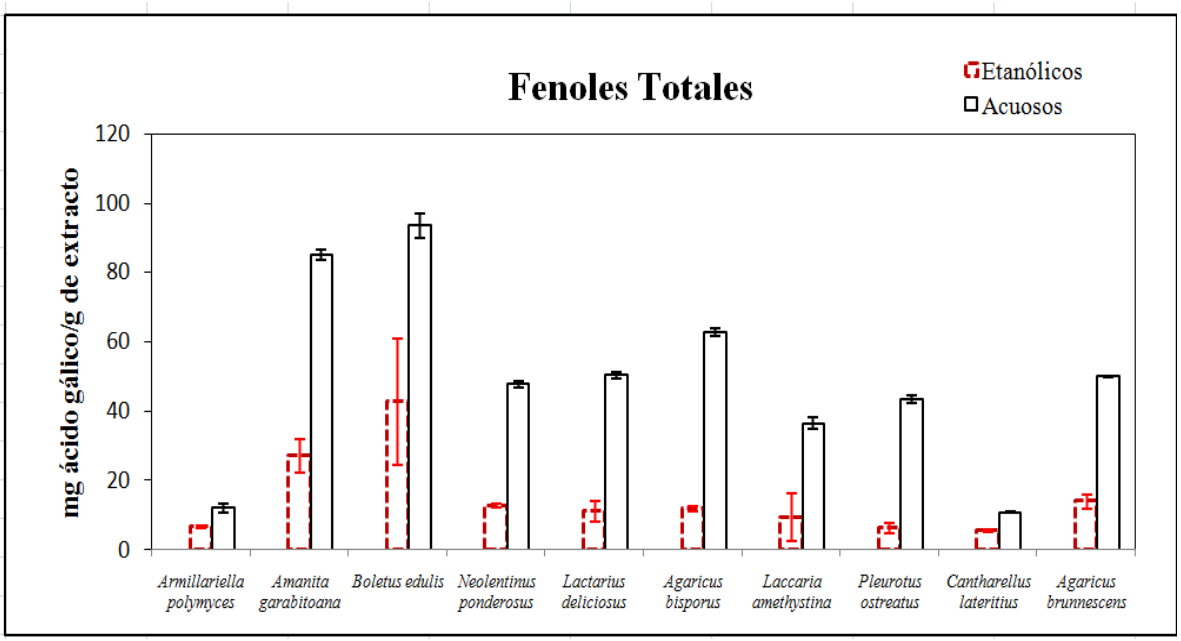
Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT.

[a] Ensayo realizado por duplicado por escasez de extracto. [b] Marroquín, (2011). NA= No Aplica *Intervalo de confianza al 95%.

Cuadro 6. Resumen de resultados obtenidos; actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales en extractos de las diez especies de basidiomicetos comestibles en Guatemala

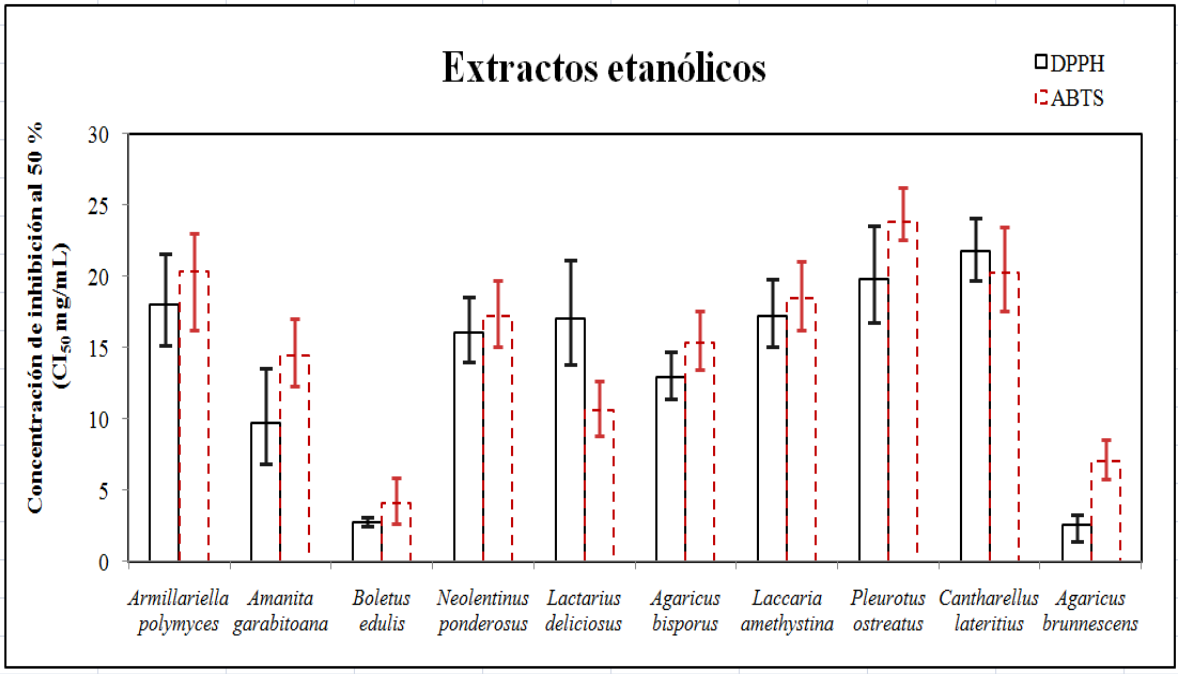
		Cuantificación de Fenoles Totales	Determinación de la Actividad Antioxidante			
Especie	**Extracto**	**µg ácido gálico / mg de extracto**	**Cromatografía en capa fina**	**DPPH CI_{50} (mg/mL)***	**ABTS CI_{50} (mg/mL)***	**TEAC (µmol/g extracto)**
Armillariella	Etanólico	06.75 ± 01.24	++	18.04 (15.12 - 21.63)	20.32 (16.23 – 23.01)	03.90
polymyces	Acuoso	12.10 ± 00.41	++	04.80 (03.95 - 05.80)	04.32 (03.26 – 05.65)	15.51
Amanita	Etanólico	27.11 ± 01.49	+++	09.70 (06.84 - 13.51)	14.45 (12.29 – 17.01)	04.66
garabitoana	Acuoso	84.98 ± 04.81	++++	01.18 (01.07 - 01.29)	02.86 (02.29 – 03.56)	15.99
Boletus	Etanólico	42.70 ± 03.48	++++	02.75 (02.46 - 03.07)	04.13 (02.67 – 05.88)	09.15
edulis	Acuoso	93.46 ± 18.17	++++	00.93 (00.65 - 01.28)	00.96 (00.63 – 01.35)	22.37
Neolentinus	Etanólico	12.80 ± 00.91	+++	16.10 (14.03 - 18.51)	17.21 (15.07 – 19.70)	04.00
ponderosus	Acuoso	47.82 ± 00.64	++	06.56 (06.17 - 06.97)	04.06 (03.24 – 05.86)	14.98
Lactarius	Etanólico	11.14 ± 00.92	+++	17.04 (13.82 - 21.12)	10.59 (08.84 – 12.64)	05.91
deliciosus	Acuoso	50.46 ± 02.97	++++	02.10 (01.78 - 02.95)	03.89 (03.41 – 04.47)	15.63
Agaricus	Etanólico	11.86 ± 01.07	++++	12.94 (11.40 - 14.70)	15.38 (13.49 – 17.56)	04.71
bisporus	Acuoso	62.92 ± 00.71	++++	02.45 (02.00 - 02.94)	03.85 (03.15 – 04.65)	15.96
Laccaria	Etanólico	09.42 ± 01.73	+++	17.24 (15.03 - 19.82)	18.48 (16.26 – 21.08)	04.26
amethystina	Acuoso	36.48 ± 06.93	++	04.55 (03.61- 05.69)	04.22 (03.83 – 04.64)	14.83
Pleurotus	Etanólico	06.15 ± 01.14	++	19.86 (16.81 - 23.59)	23.81 (22.61 – 26.21)	03.89
ostreatus	Acuoso	43.32 ± 01.53	++	04.79 (03.41- 06.61)	03.95 (03.42 – 04.60)	15.29
Cantharellus	Etanólico	05.44 ± 00.08	++	21.75 (19.73 - 24.13)	20.27 (17.57 – 23.49)	03.91
lateritius	Acuoso	10.87 ± 00.46	++	06.80 (06.22 - 07.44)	06.17 (05.53 – 06.90)	11.70
Agaricus	Etanólico	14.03 ± 00.76	++++	02.61 (01.87 - 03.25)	07.08 (05.82 – 08.52)	08.24
brunnescens	Acuoso	50.02 ± 02.07	+++	03.91 (02.97- 05.05)	03.72 (02.86 – 04.74)	18.26
TROLOX	Estándares		NR	0.171 (0.137- 0.203)	0.190 (0.121 – 0.255)	NA
Vitamina C			NR	0.128 (0.099 - 0.175)	0.016 (0.010 – 0.023)	NA
Vitamina E			NR	0.279 (0.233 - 0.322)	0.384 (0.327 – 0.415)	NA
Quercetina			+++	0.041 [c]	0.113 [c]	NA
Rutina			++++	0.189 [c]	0.423 [c]	NA
TBHQ			+++	0.120 [c]	0.396 [c]	NA

Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT *****Intervalos de confianza al 95%. NR= No Realizado NA= No Aplica [c]Marroquín (2011).
DPPH= 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo. ABTS= 2,2´-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). TEAC= Capacidad antioxidante equivalente a trolox



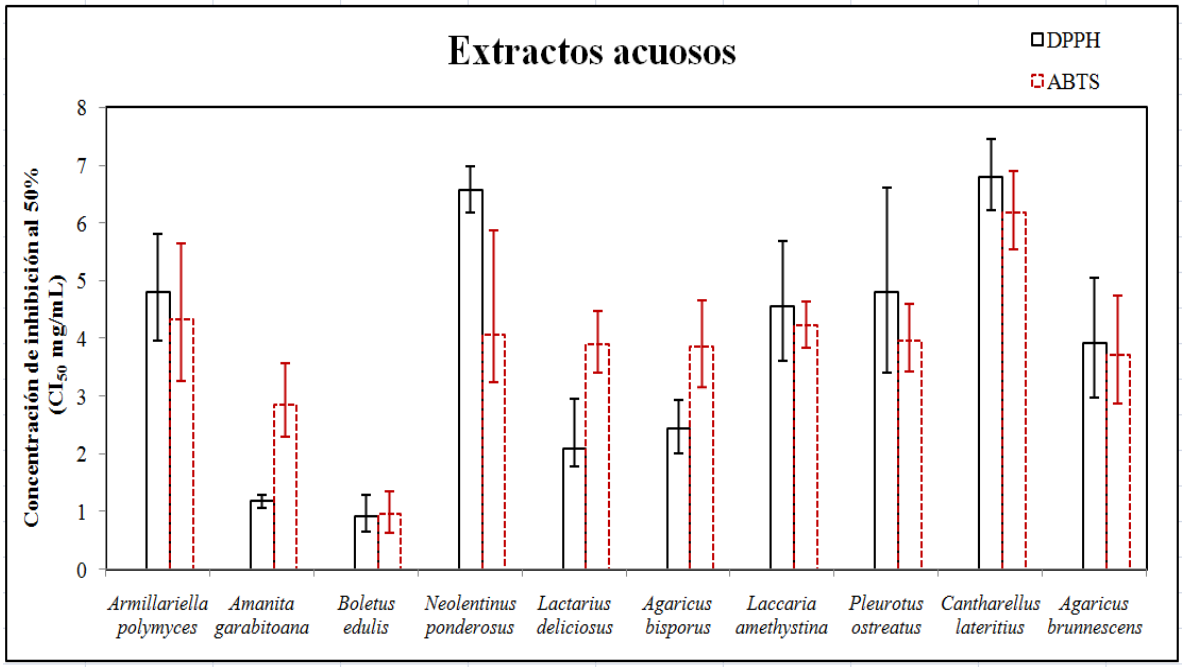
Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT

Gráfica 1. Cuantificación de fenoles totales por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu en extractos etanólicos y acuosos.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT

Gráfica 2. Determinación de la actividad antioxidante por medio de la técnica DPPH en comparación con la técnica ABTS de extractos etanólicos según el valor de CI_{50}.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT

Gráfica 3. Determinación de la actividad antioxidante por medio de la técnica DPPH en comparación con la técnica ABTS de extractos acuosos según el valor de CI_{50}.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observan las diez especies utilizadas en esta investigación, todas son especies nativas o cultivadas de amplia distribución en regiones de climas templados como: Chimaltenango, Huehuetenango, Quetzaltenango, Quiché, Sololá, etc. En regiones como Tecpán Guatemala y Atitlán, se cultivan algunas especies de hongos para su comercialización en mercados de todo el país, mientras que otras especies son recolectadas y comercializadas solamente en mercados locales (Bran et al., 2003).

Los porcentajes de rendimiento obtenidos fueron mejores en los extractos etanólicos que en los acuosos con excepción de *A. polymyces, L. amethystina* y *C. lateritius.* El mejor rendimiento de los extractos etanólicos se obtuvo con *A. bisporus* (28%) seguido de *A. brunnescens* (23%) y *N. ponderosus* (19%), de los extractos acuosos el mejor rendimiento se obtuvo de *N. ponderosus* (13%). Los porcentajes de rendimiento pudieron ser afectados por factores como el proceso de extracción, la naturaleza de los metabolitos (polar o apolar) y el disolvente utilizado. Se obtuvo una mayor eficiencia de extracción de metabolitos con el etanol al 95% ya que este tiene afinidad por metabolitos polares y apolares, mientras que el agua posee afinidad únicamente por metabolitos polares (Tsai et al., 2006).

El método cualitativo de cromatografía en capa fina se realizó como tamizaje, revelando actividad positiva todos los extractos evaluados como se observa en el Cuadro 2. Lo cual sirvió para orientar la cuantificación.

En el Cuadro 3 y Gráfica 1 se presenta la cuantificación de fenoles totales en la cual *B. edulis*, tanto en el extracto etanólico como acuoso, presentó la mayor cantidad (42.70 ± 03.48 y 93.46 ±18.17 µg ácido gálico/mg de extracto), seguido de los extractos acuosos de *A. garabitoana* (84.98 ± 04.81 µg ácido gálico/mg de extracto) y *A. bisporus* (62.92 ± 00.71 µg ácido gálico/mg de extracto). Las especies que reportaron menor cantidad de fenoles totales fueron los extractos etanólicos de *C. lateritius* y *P. ostreatus*, por lo que se esperaría una menor actividad antioxidante. Sin embargo, en estudios previos el extracto etanólico liofilizado del micelio de *P. ostreatus* ha demostrado una mayor actividad antioxidante (6.74 mg/mL); lo que confirma que la liofilización de los extractos conserva al máximo los compuestos fenólicos relacionados al potencial antioxidante (Vamanu, 2012).

Se ha reportado una correlación directa entre la actividad antioxidante de los basidiomicetos y el contenido de fenoles totales, por lo que se esperaría que en las demás técnicas se reporte una actividad antioxidante que correlacione con la cantidad de fenoles totales encontrados (Barros et al., 2008).

En estudios recientes realizados en hongos comestibles se reporta actividad antioxidante atribuida al contenido de fenoles; estos estudios reportan en *B. edulis* valores de fenoles totales 31.64 ± 0.55 y 12.77 µg/mg en el extracto metanólico, 5.73 ± 0.05 µg/mg en el extracto etanólico y 5.81 ± 0.10 µg/mg en el extracto acuoso (Sarikurkcu, Tepe & Yamac, 2007; Keleş, Koca & Gençcelep, 2011; Tsai, et al., 2006). Yang, et al. (2001) reportaron para *P. ostreatus* valores de fenoles totales 15.7 ± 0.10 µg/mg en el extracto etanólico y 12.1 ± 0.10 µg/mg en el extracto metanólico (Elmastas et al., 2007).

En el Cuadro 4, Gráficas 2 y 3 se presentan los resultados obtenidos por medio del ensayo macrométrico de reducción del radical DPPH, en la cual se determinó que la mejor actividad antioxidante la presentó el extracto acuoso de *B. edulis* con un (CI_{50} de 0.93 mg/mL, IC95% 00.65 - 01.28) y etanólico con un (CI_{50} de 2.75 mg/mL, IC95% 02.46 - 03.07), ya que inhibió el 50% de los radicales de oxidación con la menor cantidad de extracto. El extracto que presentó la segunda mejor actividad fue el extracto acuoso de *A. garabitoana* (CI_{50} 01.18 mg/mL, IC95% 01.07 - 01.29), mientras que el que presentó la menor actividad fue el extracto etanólico de *P. ostreatus* (CI_{50} 23.81 mg/mL, IC95% 22.61 – 26.21). Se pudo observar que los extractos acuosos presentaron mayor actividad en comparación con los etanólicos, esto demuestra que la naturaleza de los metabolitos produce una diferencia en la actividad antioxidante. Al comparar los resultados de los extractos con los estándares de referencia se puede observar que los estándares presentan una actividad antioxidante muy superior a los extractos analizados, la especie que más se acerca a la CI_{50} de los estándares es el extracto acuoso de *B. edulis*.

En estudios realizados en *B. edulis* se reportan valores de CI_{50} de 1.75 mg/mL en el extracto etanólico (Tsai et al., 2006). Así mismo se ha reportado actividad antioxidante de las especies estudiadas como los extractos metanólicos de *A. bisporus* (CI_{50} 4.49mg/ml) y *L. deliciosus* (CI_{50} 8.52mg/ml) por el método de DPPH; comparando los resultados con los obtenidos en dicha investigación se puede notar cierta discordancia la cual puede deberse a condiciones analíticas y metodológicas utilizadas (Barros et al., 2008; Ferreira et al., 2007).

En el Cuadro 5, Gráficas 2 y 3 se observan los resultados de la actividad antioxidante obtenidos por el método de ABTS reportando la mayor actividad en el extracto acuoso de *B. edulis* (CI_{50} 0.96 mg/mL, IC95% 0.63 – 1.35). También se demostró que los extractos acuosos presentaron mejor actividad antioxidante que los extractos etanólicos. Los estándares, al igual que en el método DPPH, presentaron mejor actividad antioxidante en comparación con los extractos estudiados. Siendo *B. edulis* la especie que se acerca más al CI_{50} de los estándares.

Con el método de ABTS se observó una menor actividad antioxidante que con DPPH; esto indica que los compuestos con características apolares que están presentes en cada uno de los extractos no presentan mucha actividad antioxidante en comparación con los compuestos con características polares.

Respecto a la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), se observó que los extractos acuosos presentaron los valores más altos, obteniendo el mejor resultado con el extracto acuoso de *B. edulis* con un valor de 22.37 µmol/g extracto; el resto de las especies evaluadas muestran una tendencia similar lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante DPPH y ABTS.

Comparando las metodologías, varios autores reportan que el método de radical DPPH es un método fácil, simple y reproducible; el radical sintético utilizado es más estable y menos fotosensible que el radical catiónico ABTS (Kuskoski, 2005). Se obtuvo alta reproducibilidad tanto en ABTS como en DPPH además de presentar intervalos de confianza con una amplitud considerablemente estrecha; lo cual indica que no hay mucha dispersión entre las mediciones de las tres réplicas realizadas. Con el método de DPPH se obtuvieron menores CI_{50}, indicando que posiblemente los metabolitos de los basidiomicetos que confieren propiedades antioxidantes poseen características polares.

Se mostró que cada extracto posee una tendencia similar en la cuantificación obtenida mediante las diferentes técnicas utilizadas, la especie que reflejó mayor cantidad de fenoles totales reportó la mejor actividad antioxidante en las dos metodologías de cuantificación, evidenciando que los compuestos ricos en polifenoles son los que mayor actividad antioxidante presentan lo cual permite correlacionar con estudios previos (Caballeros, 2001; Barros et al., 2008).

Las metodologías de evaluación antioxidante muestran mejores resultados en los extractos acuosos a pesar de tener un menor rendimiento. Esto aporta una valiosa información ya que el extracto acuoso se asemeja a la forma natural del consumo de los hongos en la dieta humana.

Con estos hallazgos se evidencia el potencial de los hongos para ser utilizados como agentes protectores, aportando antioxidantes naturales al ser humano por medio de la dieta y de esta forma reducir el daño oxidativo.

X. CONCLUSIONES

1. Todos los extractos de los basidiomicetos evaluados presentaron actividad antioxidante *in vitro*.
2. Se demostró mayor capacidad antioxidante en los extractos acuosos en todas las técnicas cuantitativas utilizadas.
3. La especie de basidiomiceto con mayor actividad antioxidante fue *Boletus edulis.*
4. El mejor porcentaje de rendimiento de la extracción etanólica fue obtenido de *Agaricus bisporus* con 28%.
5. Se observó una relación proporcional entre la actividad antioxidante de los basidiomicetos y el contenido de fenoles totales.
6. Los resultados obtenidos fueron comparables entre los distintos métodos de cuantificación.

XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con estudios de actividad antioxidante en otras especies nativas de basidiomicetos comestibles.
2. Emplear otros métodos que determinen actividad antioxidante, los cuales no se basen en el secuestro de radicales libres como la peroxidación del ácido linoleico.
3. Realizar fraccionamientos bioguiados de las especies que presentaron mejor actividad antioxidante.
4. Establecer modelos *in vivo* y someter las especies de basidiomicetos estudiadas en la presente investigación.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, S. & Rastrelli, L. (2002). An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal of Natural Products, 65,* 1773-1776.

Argueta, J. (1983). *Estudio de los macromicetos en la ciudad de Guatemala, Mixco y San Juan Sacatepéquez*. Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Barahona, A., Bolaños, P., Calderón, P., Ramírez, I., Caballeros, K., Salazar de Ariza, J. & Velásquez, R. (2002). Actividad antioxidante de frutas autóctonas de Guatemala. Atti Resumenes. XI Congresso Italo-Latino-Americano di Etnomedicina. Roma-Pavia, Septiembre, p.9.

Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M. & Ferreira, I. (2008). Antioxidant activity of *Agaricus sp. m*ushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry, 111,* 61-66.

Bolaños, B. (2003). *Determinación de las propiedades antioxidantes de los jugos de frutas producidos industrialmente disponibles para su consumo en el área metropolitana de la ciudad de Guatemala.* Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Bran, MC., Flores, R., Morales, O. & Cáceres, R. (2003). Contribución al conocimiento de los hongos comestibles en Guatemala. *IIQB Revista científica Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia Ed. Especial 1,* 5-10.

Bran, MC., Flores, R., Morales, O., Cáceres, R., Alarcón, D., Rodríguez, E. & Salazar, J. (2004). Hongos Comestibles de Guatemala: Diversidad, Cultivo y Nomenclatura Vernácula. Guatemala. DIGI. Fase IV. Facultad de de C.C.Q.Q y Farmacia; Facultad de Agronomía. USAC. Pp. 9-11.

Caballeros, K. (2001). *Optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos.* Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Cáceres, A., Lange, K., Cruz, S., Velásquez, R., Sequeda, L. & Lima, S. (2009) Actividad antioxidante de diez especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el

desarrollo de nutriceuticos. Guatemala. CONCYT. Facultad de C.C.Q.Q y Farmacia. USAC. Pp.16-63.

Carmona, R., López, O., González, M. & Muñoz, A. (2006). Optimización del proceso de obtención del extracto acuoso de *C. officinalis. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 11,* 3-4.

Chang, S.T. 1987. World production of cultivated edible mushrooms in 1986. *Mushroom Journal Tropics, 7,* 117-120.

Cheung, LM. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry, 89,* 403-409.

Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasak, T. & Fukuoka, F. (1969). Inhibition of mouse sarcoma$_{180}$ by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.)Sing. *Nature, 222*,687-688.

Ching, S., Hall, J., Croft, K., Beilbt. J., Rossi, E. & Ghisalberti, E. (2006). Antioxidant inhibition of oxygen radicals for measurement of total antioxidant capacity in biological samples. *Analytical Biochemistry, 353*, 257-265.

Córdova, D. & Menéndez, C. (2009). *Determinación y Cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutricéuticos*. Tesis de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Cui, K., Luo, X., Xu, K. & Murthy, M. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 28*, 771-799.

Cui, Y., Kim, D-S. & Park, K-C. (2005). Antioxidant effect of *Inonotus obliquus. Journal of Ethnopharmacology, 96,* 79–85.

Curvetto, N. (2009). *Grifola frondosa* (Maitake): Su valor nutracéutico, nutricéutico, farmacéutico y cosmecéutico. *Tecnología de producción, 18,* 30-46.

Dickinson, C. J. (1979). The Encyclopedia of Mushrooms. New York:GP. Putnams sons. Pp 280.

Elmastas, M., Isildak, O., Turkekul, I. & Temur, N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis, 20,* 337-345.

Feibelman, T., Doudrick, R., Cibula, W. & Bennett, J. (1997). Phylogenetic relationships within the *Cantarellaceae* inferred from sequence analysis of the nuclear large subunit rDNA. *The British Mycological Society, 101,* 1423-1430.

Ferreira, I., Baptista, P., Vilas-Boas, M. & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry, 100,* 1511–1516.

Fraga, C., Shigenaga, M., Park, J., Degan, P. & Ames, B. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hidroxy-2'- deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America, 87,* 4533-4537.

Fürst, P. (1998). The role of antioxidants in nutritional support. *Clinical Nutrition, 17,* 4-5.

García, M. (1982). Cultivo industrial de *Pleurotus ostreatus.* España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Pp 16.

Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. & Ferro-Luzzi, A (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical & Medical Research, 18,* 29-36.

Gilbertson, R. (1974). Fungi That Decay Ponderosa Pine. University of Arizona Press: Tuscon, AZ. 32,197.

Gonçalves, E., Almeida, LM. & Dinis, TPC. (1998). Antioxidant activity of 5-aminosalicylic acid against peroxidation of phosphatidylcholine liposomes in the presence of α-tocopherol: A synergistic interaction? *Free Radicals Research, 29,* 53-66.

Good, C., Saṁnia, A., Pedrosa, R. & Salvador, S. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering, 10,* 1016-1017.

Guerbi, H., Dalaruelle, C. & Selosse, M. (1999). High genetic diversity in aprobulation of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystine* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology, 8,* 2003-2013.

Guevara, G., Garza, F. & Cázares, E. (2004). Estudio del ITS Nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. *Ciencia UANL, 2,* 285-299.

Guillot, J., Guillant, M., Damez, M. & Dusser, M. (1991). Isolation and Characterization of a Lectin from the Mushroom, *Lactarius deliciosus. The Journal of Biochemistry, 109,* 840-845.

Guzmán, G., Torres, M., Logemann, H., Argueta, J. & Sommerkamp, Y. (1985). Fungi from Guatemala I. A new species of *Morchella*. *Mycología Helvetica, 1,* 450-456.

Halling, R., Mueller, G. (2004). Mushrooms of the Talamancas, Costa Rica: *Amanita garabitoana* Halling & G.M. Muell. Hongos seta de Talamanca, Costa Rica. Biblioteca Organización para Estudios Tropicales (OET) *16,* 20.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. (2007). Free radicals in Biology and Medicine. United States. Fourth edition. Biosciences OXFORD. Pp.776.

Halliwell, B., Gutteridge, J. & Cross, C. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *Journal of Laboratory Clinical Medicine, 119,* 598-620.

He, J., Ru, Q., Dong, D. & Sun, P. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules, 17,* 4373-4387.

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

Hiroshi, S. & Takeda, M. (1993). Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. In: Chang ST, Buswell JA, Chiu SW, et al, (ed). *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Hong Kong: Chinese University Press. Pp.237-245.

Hoffman-La Roche ltd. (1994). Vitamins basics. (1st ed.) New York: Seaboard Lithographers. Pp. 52.

Hu, M., Louie, S., Cross, C., Motchnik, P. & Halliwell, B. (1993). Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 121,* 257-262.

Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M. & Fukuoka, F. (1969). Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research, 29,* 734-735.

Imark, C., Kneubühl, M. & Bodmer, S. (2001). Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 1,* 239- 243.

Jayakumar, T., Ramesh, E. & Geraldine, P. (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus,* on CCl_4-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology, 44,* 1989-1996.

Keleş, A., Koca, I. & Gençcelep, H. (2011). Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *Food Procesing & Technology, 2*, 130-136.

Kerrigan, R., Carvalho, D., Horgen, P. & Anderson, J. (1995). Indigenous and introduced populations of *A. bisporus*, the cultivated botton mushroom, in eastern and western Canada: Implications for population biology, resource management and conservation of genetic diversity. *Journal of Botany, 73*, 1925-1938.

Kohen, R. & Nyska (2002). Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology, 30*, 620-650.

Kosem, N., Han, Y. & Moongkarndi, P. (2007). Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *Science Asia, 33*, 283-292.

Kuskoski, E. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Tecnología de Alimentos, 25*, 726-732.

Laranjinha, J., Almeida, L. & Madeira, V. (1992). Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: Quenching of cis-parinaric acid fluoescence. *Archives of Biochemical and Biophysics, 297*, 147-154.

León, R. (2003). Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. *Red de revistas científicas de América Latína y el Caribe, España y Portugal 2003, 15*, 31-35.

Lima, S. (2003). *Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (Solanum americanum) y mamey (Mammea americana).* Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Lindquist, U., Timo, H. & Jülich, W. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Medical, 2*, 285–299.

Liu, F., Ooi, V. & Chang, S. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysacharide extracts. *Life Science, 64*, 1005-1011.

Lock, O. (1998). Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales. Perú: Fondo editorial de la Pontificia Universidad del Perú. Pp 213.

Lorenzana, R. (2009). *Determinación de la actividad inmunomoduladora de dos extractos de Grifola frondosa (Dicks.:Ff.) S.F. Gray, mediante un ensayo linfoproliferativo in vitro.* Tesis

de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Lowy, B. (1971). New record of mushrooms stones from Guatemala. *Mycology, 63*, 983-993.

Mahler, J. (2006). *Descripción de las características del cultivo in vitro y producción de inoculo de cuatro cepas nativas de Neolentinus spp.* Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Márquez, E. (2001). *Taxonomía de los macromicetos encontrados en la finca El Aprisco, localizada en Chipachec, municipio de Totonicapán*. Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Marroquín, N. (2011). *Comparación de la Actividad Antioxidante, Detección y Cuantificación de Flavonoides y Compuestos Fenólicos en tres Especies de la Familia Passifloracea (Passiflora edulis, Passiflora incarnata, Passiflora ligularis*). Tesis de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

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

Masihi, K. (2002). Immunomodulators in infectious diseases. *Panoply of possibilities International Immunopharmacology, 22*, 1083-1091.

Mathew, S. & Abraham, T. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food & Chemical Toxicology, 44*, 198-206.

Mau, J., Lin, H., & Song, F. (2002). Antioxidant properties of several speciality mushrooms. *Food Research International, 35*, 519-526.

Mazariegos, A. (2009). *Determinación de la actividad inmunomoduladora del hongo Grifola frondosa por medio de un ensayo hemolítico para la valoración de la actividad del sistema de complemento*. Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Memorias del I Coloquio Internacional de Mayistas. (1987). México: Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 1005-1093.

Mendoza, R. & Montoya, G. (1981). Las Setas: Manual práctico para el aficionado. Bilbao Ibeduero. Pp. 389.

Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom. *Foods Review International, 11*, 7-21.

Mizuno, T. (1999). The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 1,* 9-30.

Oliveira, D., Da Silva, L. & Tallarico, M. (2010). Antibiotics: Therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents *Química Nova 33*, 667-679.

Osorio, M. & Salamanca, G. (2005). Propiedades Fisicoquímicas y valor nutricional del Champiñón *Agaricus bisporus*. *Grupo de Investigaciones Mellitopalinológicas y Propiedades Fisicoquímicas de Alimentos Universidad del Tolima*. *Colombia*. Recuperado de Scribd http://es.scribd.com/doc/14831370/Agaricus-bisporus.

Paz, M., Cáceres, A., Cóbar, O., Álvarez, E., Gaitan, I., Paredes, E., et al. (2011). Composición química, actividad inmunomoduladora y biocida de basidiomicetos comestibles de Guatemala. Guatemala. CONCYT. Facultad de C.C.Q.Q y Farmacia. USAC. Pp. 102.

Phipps, S., Sharap, M. & Butterweck, V. (2007) Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum, 33*, 810-814.

Rau, U., Kuenz, A., Wray, V., Nimtz, M., Wrenger, J. & Cicek, H. (2009). Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes* (Coriolus) *versicolor* ATCC 200801. *Journal of Applied Microbiology and Biotecnology, 81*, 837-837.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, N. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine, 26*, 1231-1237.

Redhead, S. & Ginns, J. (1985). A reappraisal of agaric genera associated with brown of woods. Trans. *Mycology. Soc. Japan. 26,* 349-381.

Rodriguez, C., Ramírez, K., González, N., Oliva, S. & Sánchez, E. (2009). *Determinación de la actividad inmunomoduladora de los basidiomicetos comestibles Cantharellus lateritius Singer (Berk) Singer, Armillariella polymyces (Pers.: Letell.) Sing & Clem, Laccaria amethystina Cooke, Lactarius deliciosus (L. ex Fr) S. F. Gray y Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) Kumm.* Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Sarikurkcu, C., Tepe, B. & Yamac, M. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, eskisehir-Turkey: *Lactarius deterrimus, Suillus collitinus, Boletus edulis, Xerocomus chrysenteron*. *Boresource Technology, 99*, 6651-6655.

Schepetkin, I. & Quinn, M. (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation therapeutic potential. *International Immunopharmacology 6*, 317-333.

Sharma, H., Hanna, A., Kauffman, E. & Newman, A. (1995). Effect of herbal mixture student Rasayana on lipoxygenase activity and lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine, 18*, 687-697.

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

Singleton, V. & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomollybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16*, 144-158.

Soares, J., Dinis, T., Cunha, A. & Almeida, L. (1997). Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis. Free Radical Research, 26*, 469-478.

Soeroes, C., Kienzi, N., Ipoly, I., Dernovics, M., Fodor, P. & Kuehnelt, D. (2005). Arsenic uptake and arsenic compounds in cultivated *Agaricus bisporus*. *Food Control, 16*, 459-464.

Sommerkamp, Y. (1984). *Estudio de los macromicetos del Biotopo Universitario "Licenciado Mario Dary Rivera" para la conservación del Quetzal.* Tesis de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Sommerkamp, Y. (1990). Hongos comestibles en los mercados de Guatemala; Cuadernos de investigación. Guatemala: Dirección General de Investigación, documento técnico No. 3-90. Pp. 11-27.

Teissedre, P. & Landrault, N., (2000). Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International, 33*, 461–467.

Thomas, A. (1993). Analysis of the flavor of the dried mushroom, *Boletus edulis. Food Chemistry, 6*, 955-958.

Torricelli, R., Johansson, S. & Wiithrich (1997). Ingestive and inhalative allergy to the mushroom *Boletus edulis. Allergy, 13*, 998-999.

Tsai, S., Tsai, H. & Mau, J. (2006). Antioxidant properties of *Agaricus blazei, Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *Food Science and Technology, 40*, 1392-1402.

Tulloss, R. & Zhu, I.(1998). Studies in the Genus *Amanita* Pers. (Agaricales, Fungi). *Chinese Academy of Sciences*, *34*, 58-92.

Vamanu, E. (2012). *In Vitro* antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. *Molecules*, *17*, 3653-3671.

Vasco, C., Ruales, J. & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, *111*, 816-823.

Vilar, C., Guzmán, A. & Hicks, J. (1996). Participation of Oxygen-Free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Archives of Medical Research*, *27*, 1-6.

Volk, T., Burdsall, H. (1995). A nomenclatural study of *Armillaria* and *Armillariella* species. *Synopsis fungorum*, *43*, 25-31.

Waterhouse, A. (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols of Food Analytical Chemistry*, *6*, *I1.1.1*-I1.1.8.

Yang, J., Lin, H. & Mau, J. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, *77*, 229-235.

Zakany, J., Chihara, G. & Fachet, J. (1980). Effect of Lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic host. *International Journal of Cancer*, *25*, 371-376.

ANEXOS

DOCUMENTACIÓN FOTOGRÁFICA

Anexo 1. Primer extracto etanólico obtenido: *Cantharellus lateritius*

Rotavaporación de *Cantharellus lateritius*

Percolación de extracto etanólico *Cantharellus lateritius*, este mismo basidiomiceto fue secado por el proyecto anterior, de igual manera se secó nuevamente y se obtuvo un % de humedad menos del 10%.

Extracto etanólico condensado de *Cantharellus lateritius*

Primer extracto etanólico al 95% obtenido luego de unas semanas dentro de la secadora con silica gel. (*Cantharellus lateritius)*

Anexo 2. Segundo extracto etanólico obtenido: *Laccaria amethystina*

Percolación y extracto etanólico obtenido de *Laccaria amethystina*

Anexo 3. Tercer extracto etanólico obtenido: *Agaricus bisporus*

Envoltura con papel encerado para su conservación previo a su desecado.

Corte de *Agaricus* aff. *Bisporus* para desecación.

Colocación de *Agaricus* aff. *Bisporus* en desecadora marca NESCO. Una parte fue desecada en esta desecadora casera y el resto en el horno del LIPRONAT.

Medición del porcentaje de humedad de *Agaricus bisporus* y por consecuente percolación del mismo.

Rotavaporación del extracto y obtención del extracto etanólico de *Agaricus bisporus*

Anexo 4. Cuarto extracto etanólico obtenido: *Pleurotus ostreatus*

Percolación de *Pleurotus ostreatus* extracto etanólico, rotavaporación y obtención del extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus.*

Anexo 5. Quinto extracto etanólico obtenido: *Agaricus brunnescens*

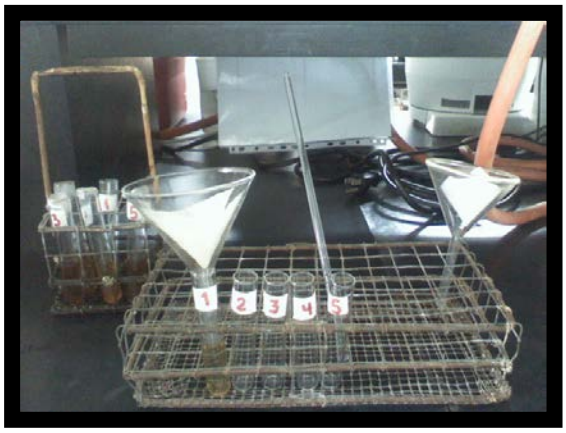
Corte y secado de *A. brunnescens*

Medición del Porcentaje de humedad y preparación del material para percolación.

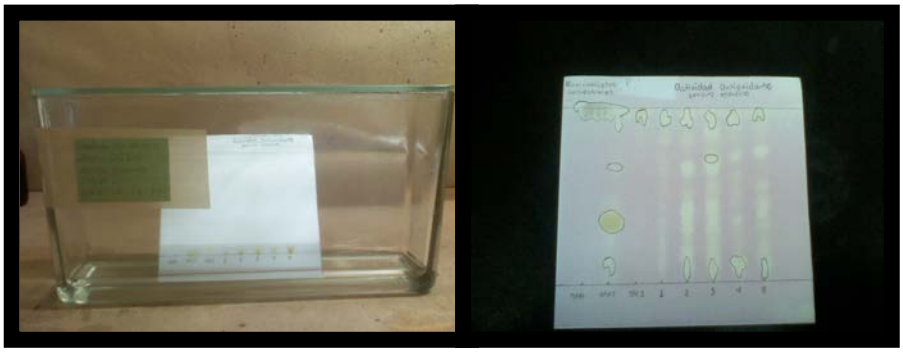
Percolación y rotavaporación.

Obtención de extracto condensado de *Agaricus brunnescens.*

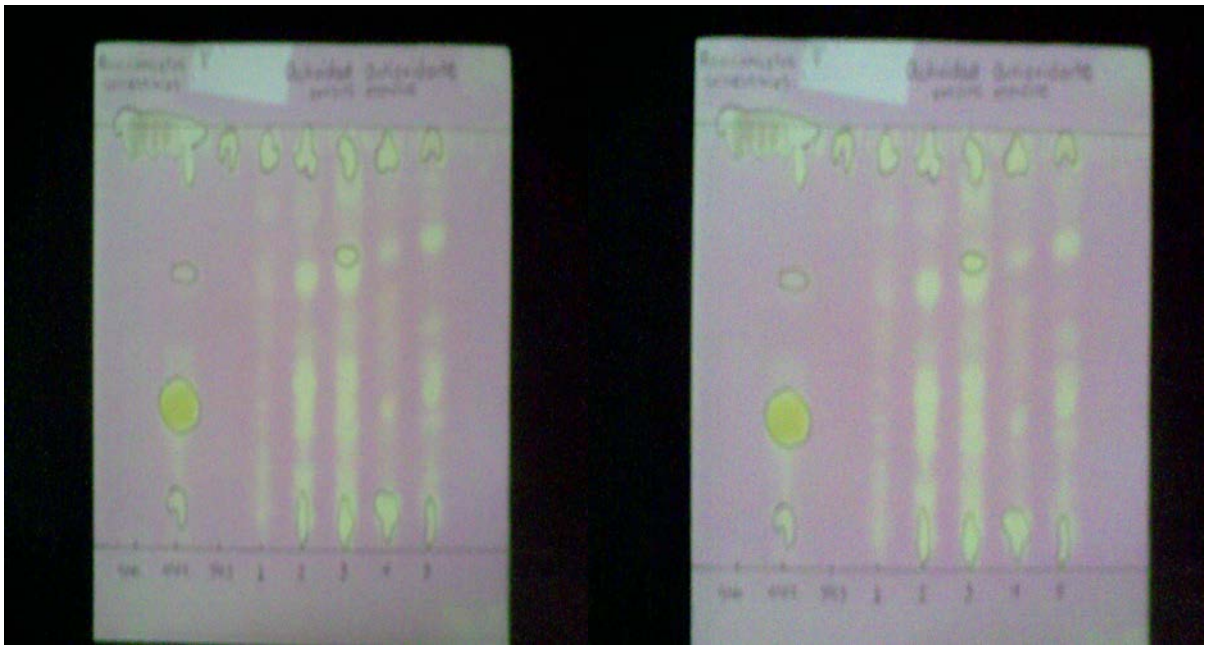
Anexo 6. Determinación de la actividad Antioxidante de los extractos etanólicos por medio de la técnica cualitativa Cromatografía en Capa Fina (CCF)



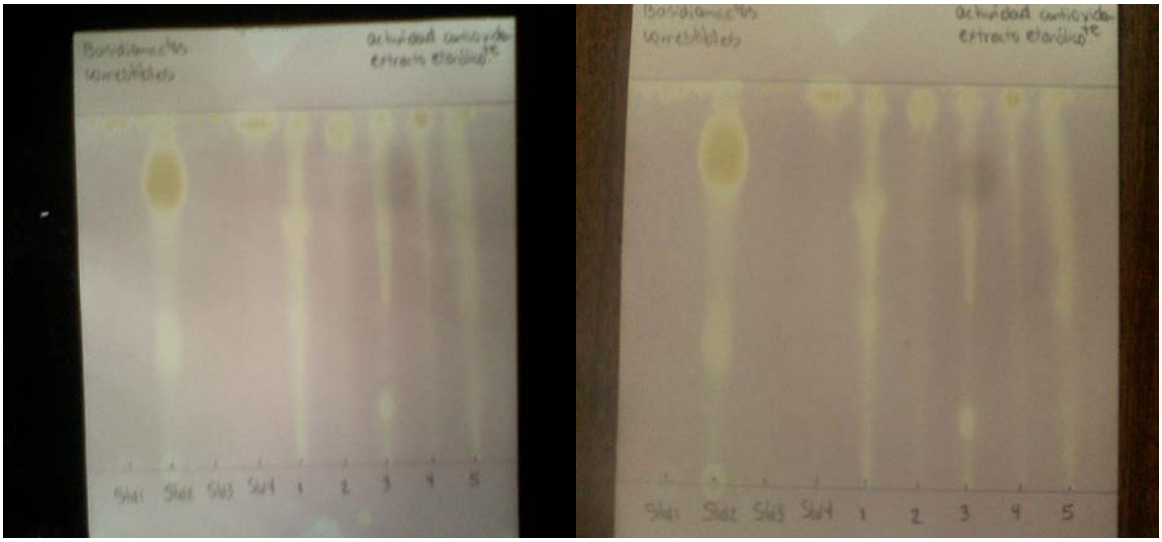
Filtración de solución madre para montaje de cromatoplaca y con ello la demostración de actividad antioxidante de 5 extractos de Basidiomicetos. (Los extractos fueron proporcionados por la unidad de bioensayos)



Cromatoplaca en fase móvil. Resultados obtenidos.



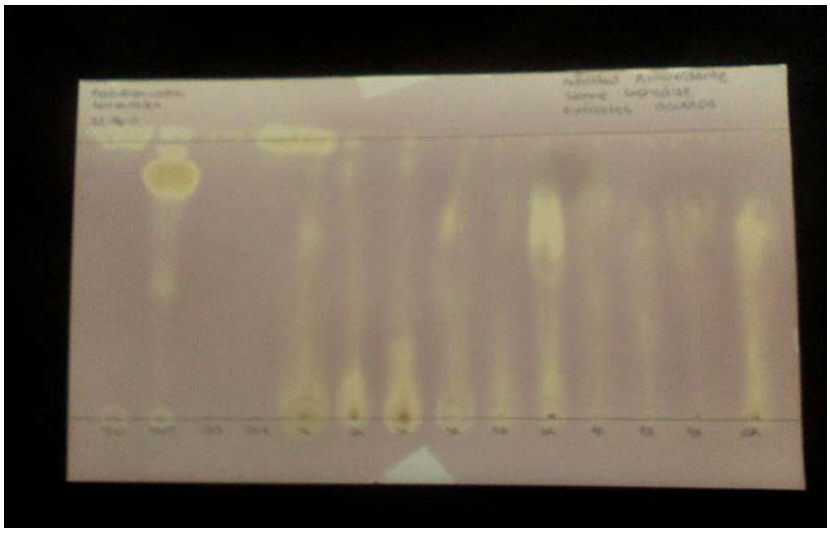
Detección: Los extractos etanólicos de *A. polymyces, A. garabitoana, B. edulis, N. ponderosus y L. deliciosus,* si presentan actividad antioxidante, se observa la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.



Cromatografía capa fina obtenida de los extractos etanólicos de *A. bisporus*, *L. amethystina*, *P. ostreatus*, *C. lateritius* y *A. brunnescens*. Detección: Los extractos si presentan actividad antioxidante, se observa decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

Anexo 7. Determinación de la actividad Antioxidante de los extractos acuosos por medio de la técnica cualitativa Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Preparación Cromatoplaca de todos los extractos acuosos.



Cromatoplaca obtenida de los diez extractos acuosos. Detección: Los extractos si presentan actividad antioxidante, se observa decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

Anexo 8. Preparación de la solución madre de los extractos etanólicos

Extracto etanólico pesado (0.1g) en balanza analítica diluido con etanol al 95% (5ml)

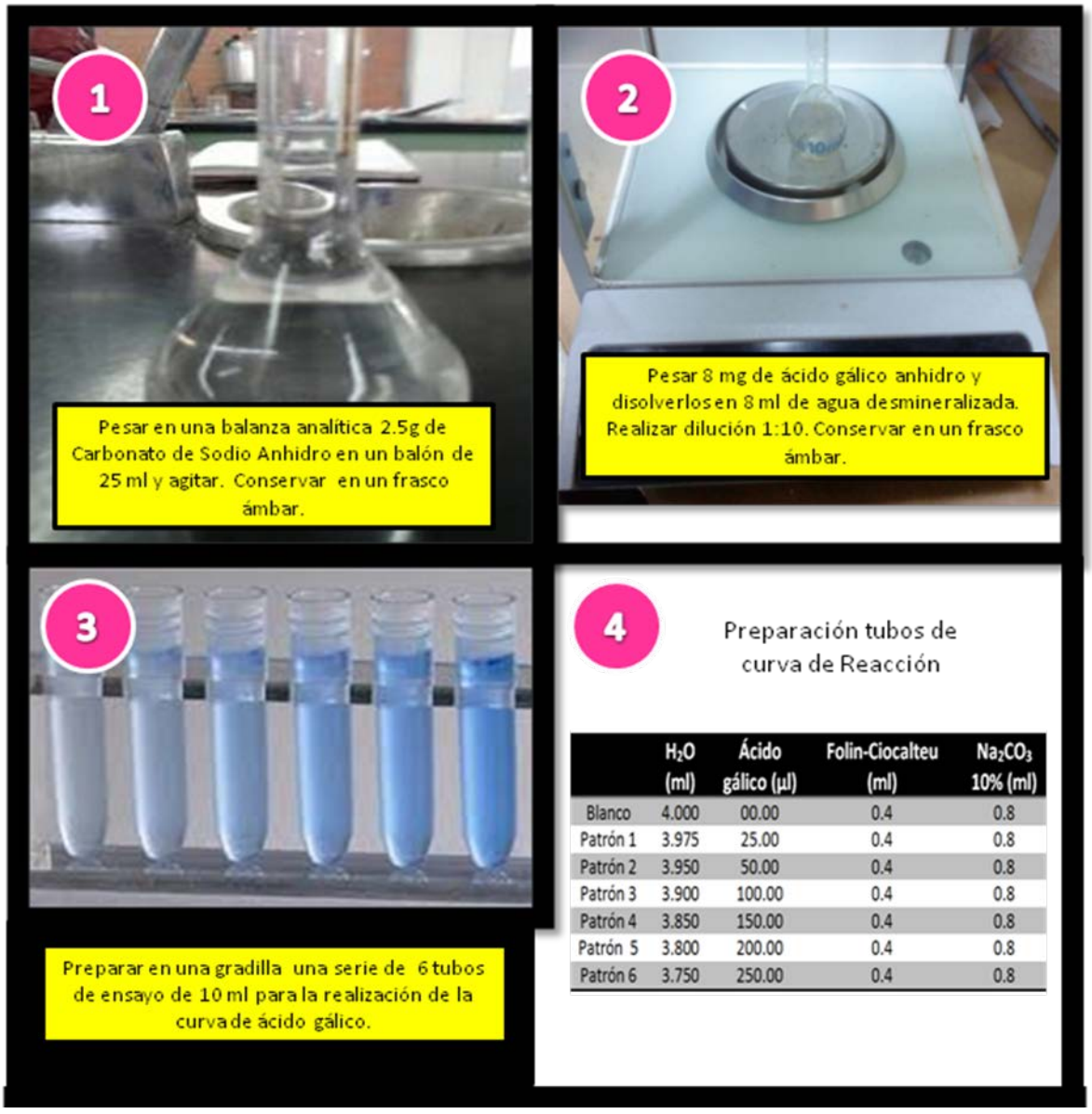
Baño ultrasónico de la solución madre de extractos y filtración de solución madre.

Anexo 9. Preparación de la solución madre del extracto acuoso por el método de Infusión

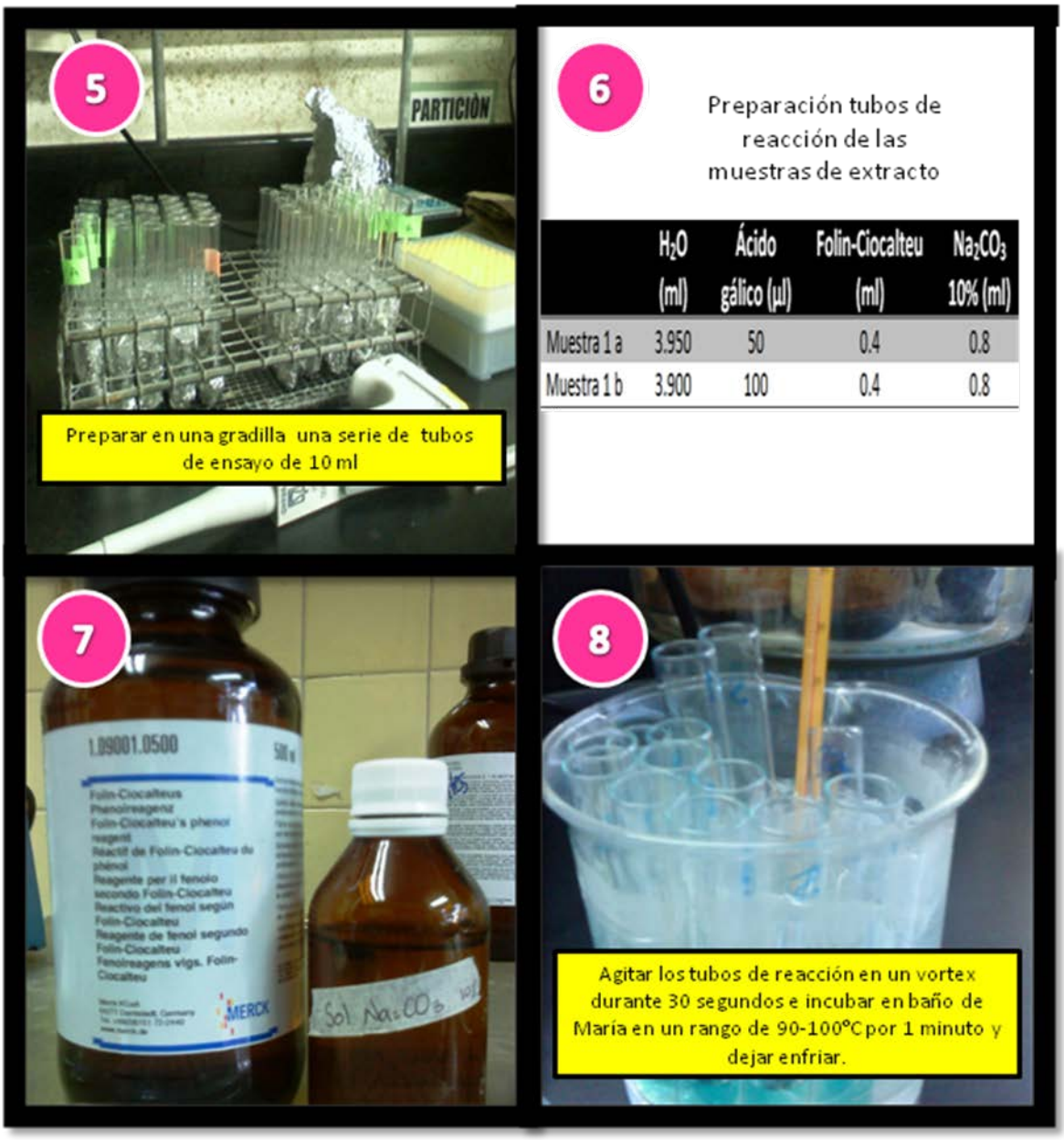
Ebullición de agua desmineralizada (200ml) para el extracto, el agua que perdida se repone posteriormente.

Hongo seco pesado (2.0 g) se deja reposar el agua junto al hongo seco para obtener la infusión. Dejar enfriar y por último filtrar.

Anexo 10. Cuantificación de Fenoles Totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu



	H_2O (ml)	Ácido gálico (µl)	Folin-Ciocalteu (ml)	Na_2CO_3 10% (ml)
Blanco	4.000	00.00	0.4	0.8
Patrón 1	3.975	25.00	0.4	0.8
Patrón 2	3.950	50.00	0.4	0.8
Patrón 3	3.900	100.00	0.4	0.8
Patrón 4	3.850	150.00	0.4	0.8
Patrón 5	3.800	200.00	0.4	0.8
Patrón 6	3.750	250.00	0.4	0.8



	H_2O (ml)	Ácido gálico (µl)	Folin-Ciocalteu (ml)	Na_2CO_3 10% (ml)
Muestra 1 a	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 1 b	3.900	100	0.4	0.8

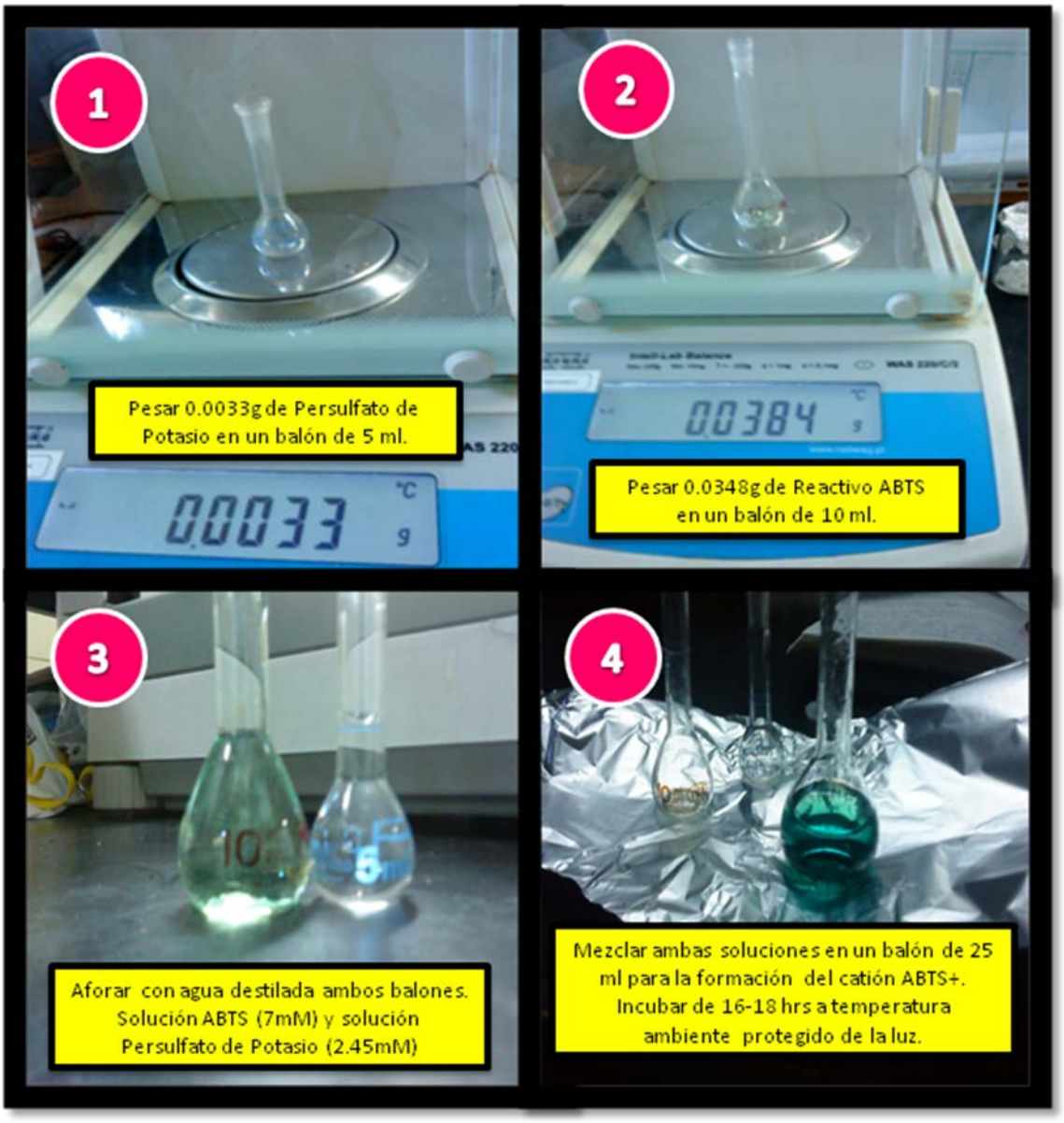
9
Realizar la lectura de absorbancia en el
espectrofotómetro a 765nm
Posteriormente realizar los cálculos respectivos.

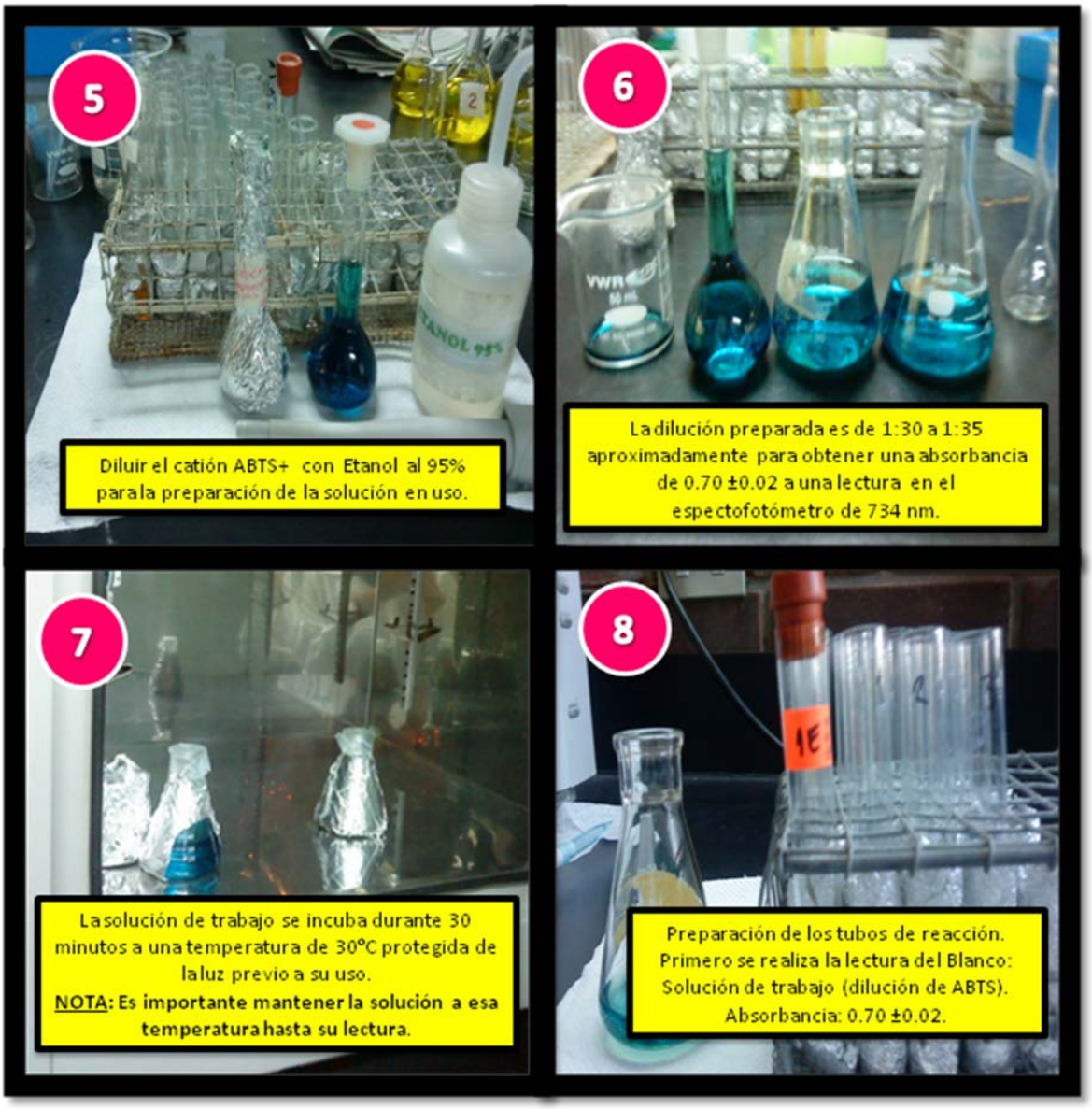
Anexo 11. Reducción del radical 1,1-difenil-2-pricrilhidrazilo (DPPH)

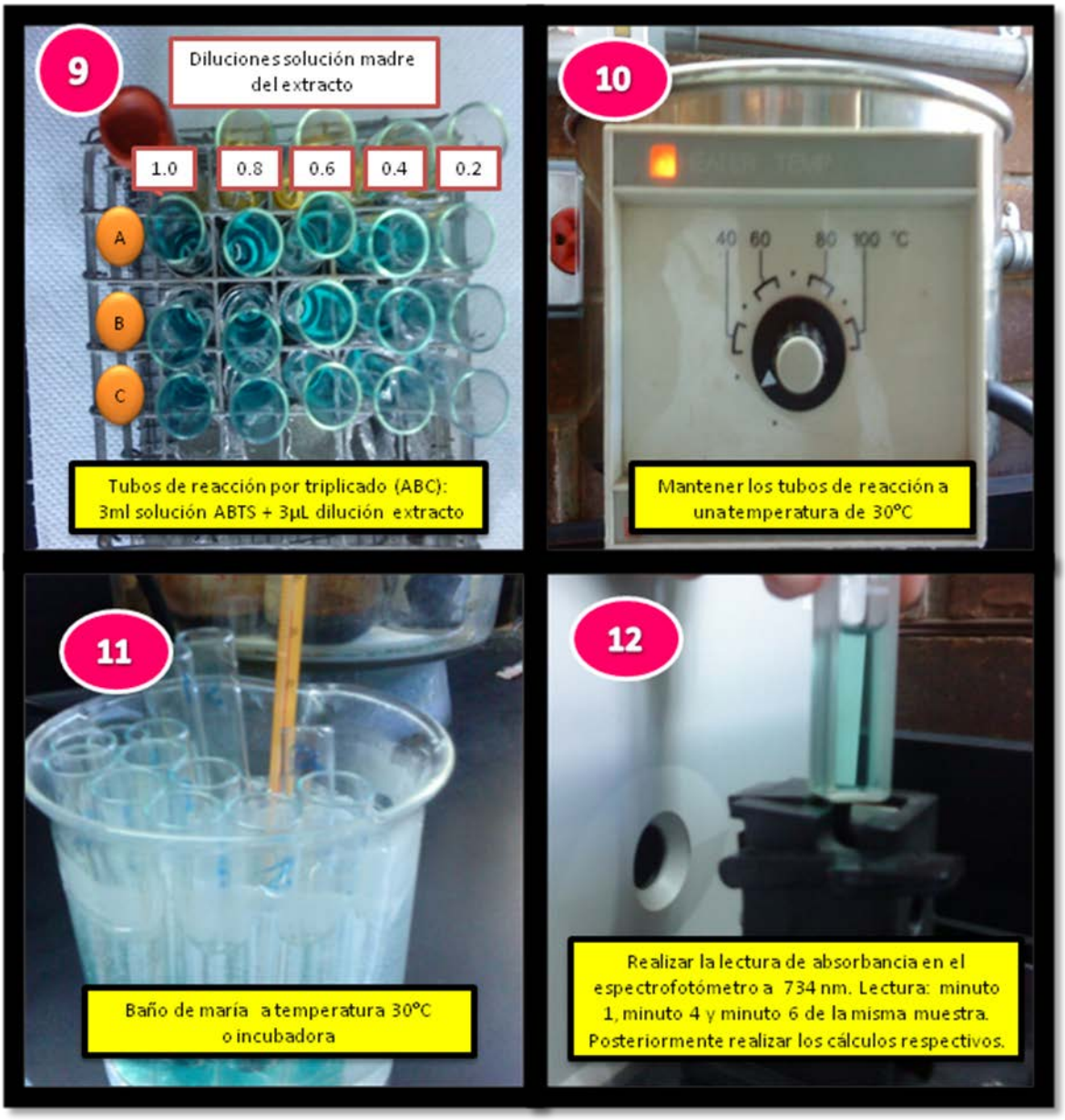
	BL	CNTR	BL.E	ENSAYO
Buffer Acetato	1ml	1ml	1ml	1ml
Metanol	2ml	1.5ml	1.9ml	1.4ml
DPPH	---	0.5ml	---	0.5ml
Dilución Mx	---	---	0.1ml	0.1ml

9
Agitar en el vortex por 15 segundos los tubos de reacción e incubar a T° ambiente por 30 minutos protegidos de la luz.
10
Leer la absorbancia a una Longitud de onda de 517 nm en un espectofotómetro. Posteriormente realizar los cálculos respectivos.

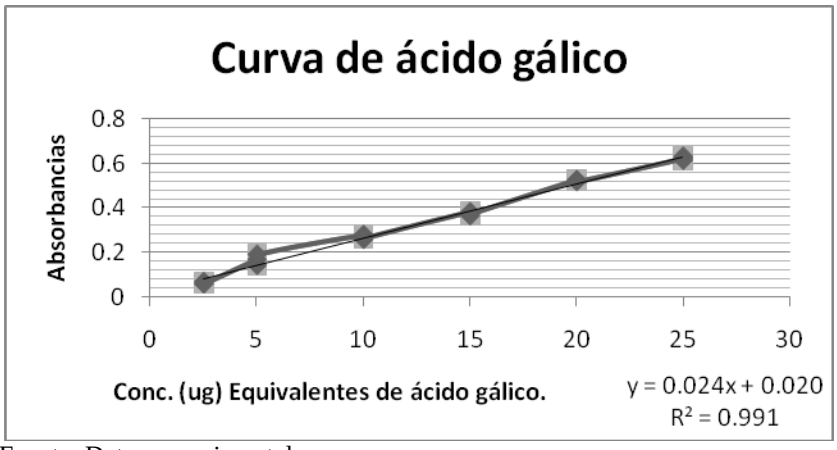
Anexo 12. Decoloración del radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(acido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) –ABTS-




5
Diluir el catión ABTS+ con Etanol al 95% para la preparación de la solución en uso.
6
La dilución preparada es de 1:30 a 1:35 aproximadamente para obtener una absorbancia de 0.70 ±0.02 a una lectura en el espectofotómetro de 734 nm.
7
La solución de trabajo se incuba durante 30 minutos a una temperatura de 30°C protegida de la luz previo a su uso.
NOTA: Es importante mantener la solución a esa temperatura hasta su lectura.
8
1E
Preparación de los tubos de reacción.
Primero se realiza la lectura del Blanco:
Solución de trabajo (dilución de ABTS).
Absorbancia: 0.70 ±0.02.


9
Diluciones solución madre del extracto
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
A
B
C
Tubos de reacción por triplicado (ABC): 3ml solución ABTS + 3µL dilución extracto
10
40 60 80 100 °C
Mantener los tubos de reacción a unatemperatura de 30°C
11
Baño de maría a temperatura 30°C o incubadora
12
Realizar la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 734 nm. Lectura: minuto 1, minuto 4 y minuto 6 de la misma muestra. Posteriormente realizar los cálculos respectivos.

Anexo 13. Gráfica de la curva de ácido gálico utilizada para el cálculo de fenoles totales.



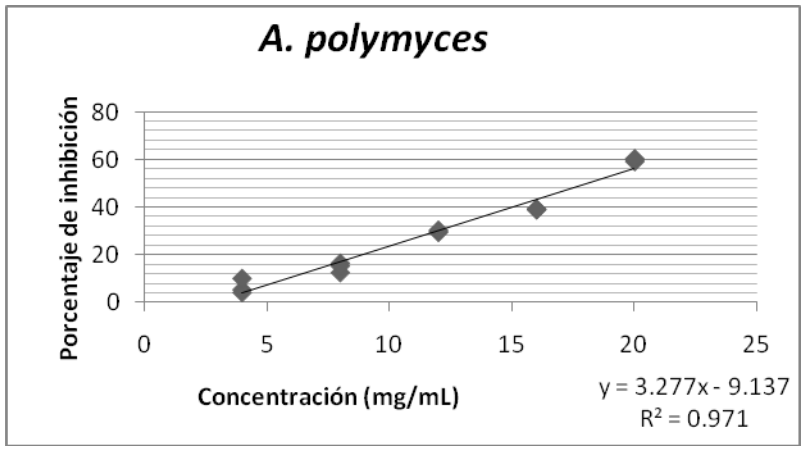
Fuente: Datos experimentales.

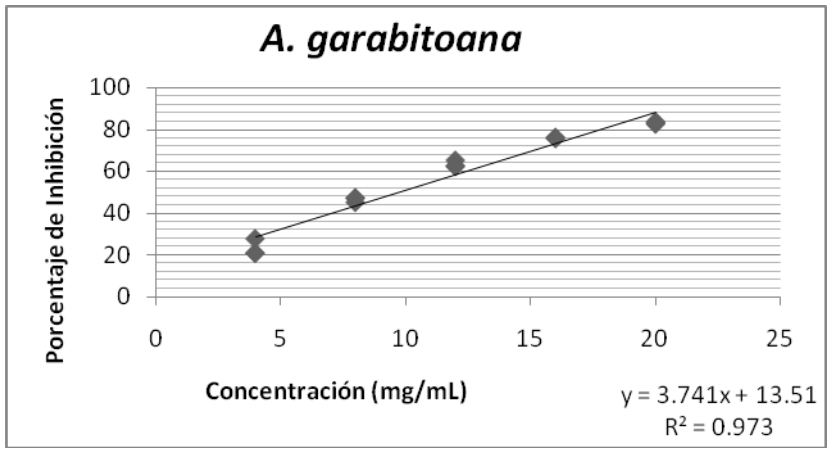
Anexo 14. Cuadro de coeficientes de correlación obtenidos en los ensayos realizados a cada extracto, etanólico y acuoso de las diez especies de basidiomicetos, incluidos los estándares.

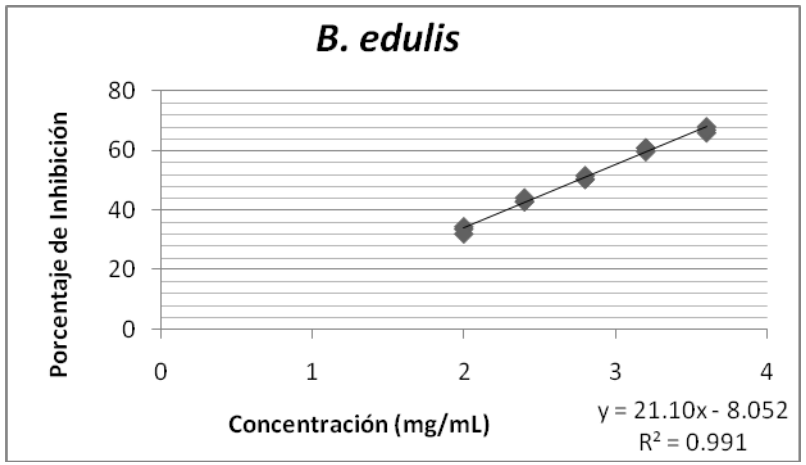
	DPPH		**ABTS**	
Especies	**Etanólico**	**Acuoso**	**Etanólico**	**Acuoso**
A. polymyces	0.971	0.982	0.971	0.968
A. garabitoana	0.973	0.994	0.980	0.972
B. edulis	0.991	0.967	0.977	0.981
N. ponderosus	0.984	0.997	0.984	0.978
L. deliciosus	0.973	0.980	0.982	0.990
A. bisporus	0.989	0.992	0.986	0.986
L. amethystina	0.983	0.976	0.984	0.994
P. ostreatus	0.972	0.975	0.989	0.982
C. lateritius	0.980	0.994	0.979	0.992
A. brunnescens	0.984	0.974	0.988	0.978
Trolox	0.998		0.977	
Vitamina C	0.982		0.971	
Vitamina E	0.987		0.971	

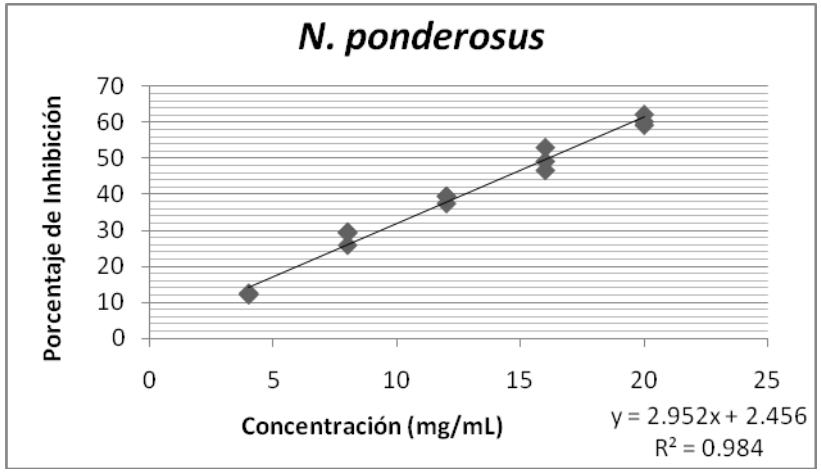
Fuente: Datos experimentales

Anexo 15. Gráficas de concentración vrs. porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos con el método DPPH de extractos etanólicos.

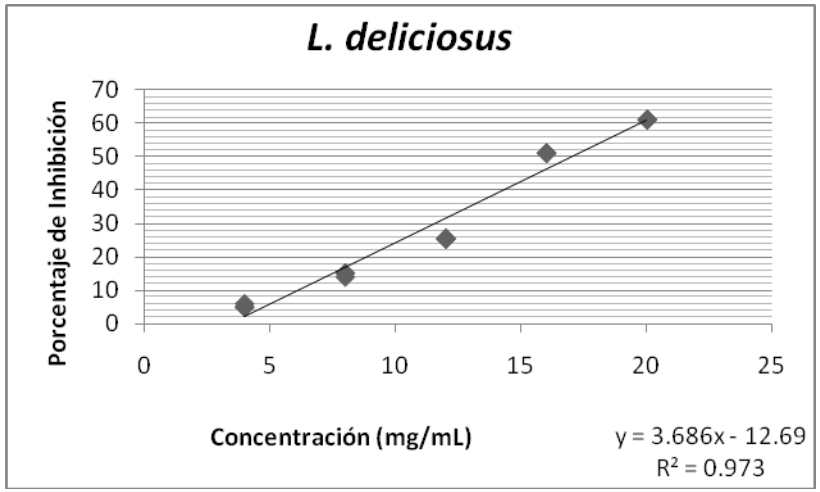


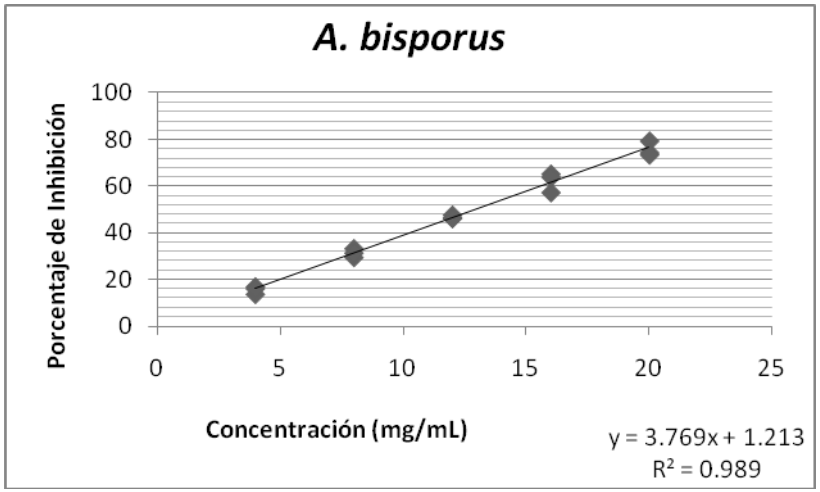


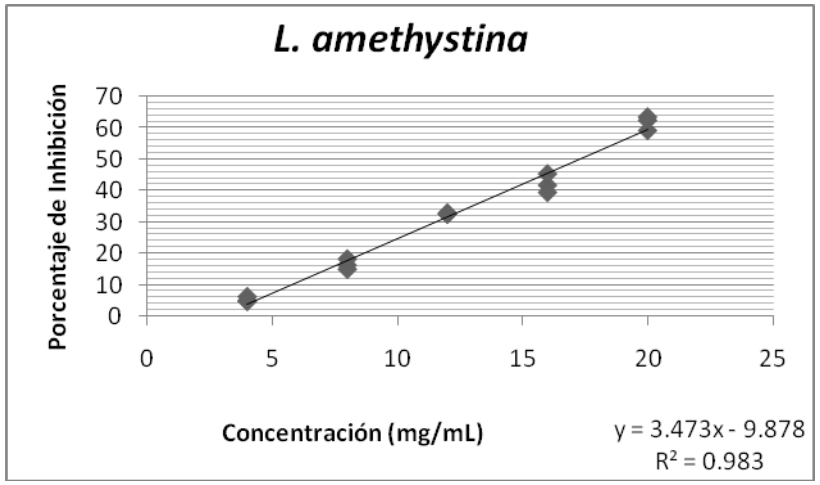


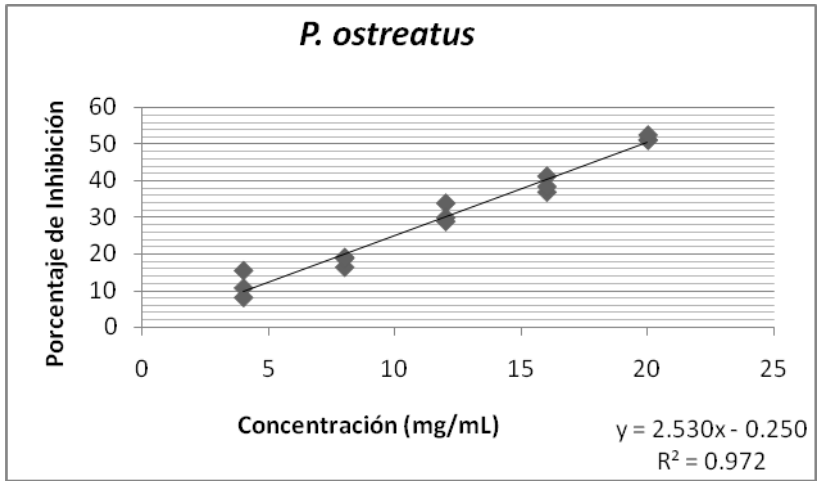


Fuente: Datos experimentales.

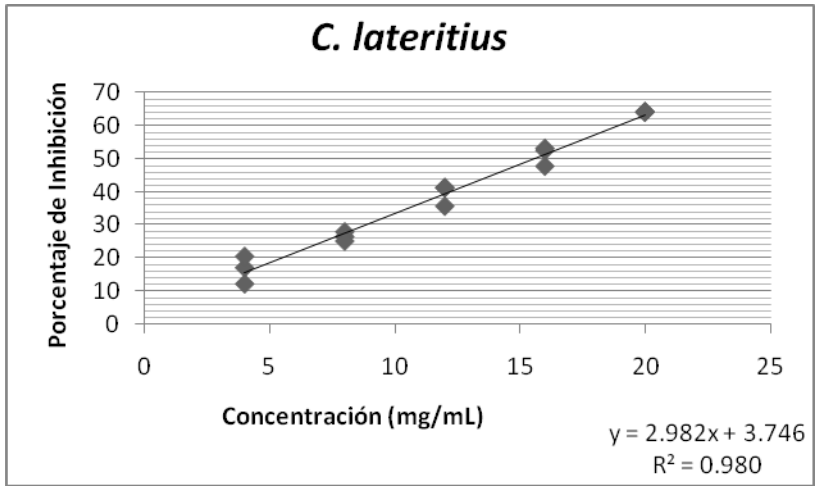


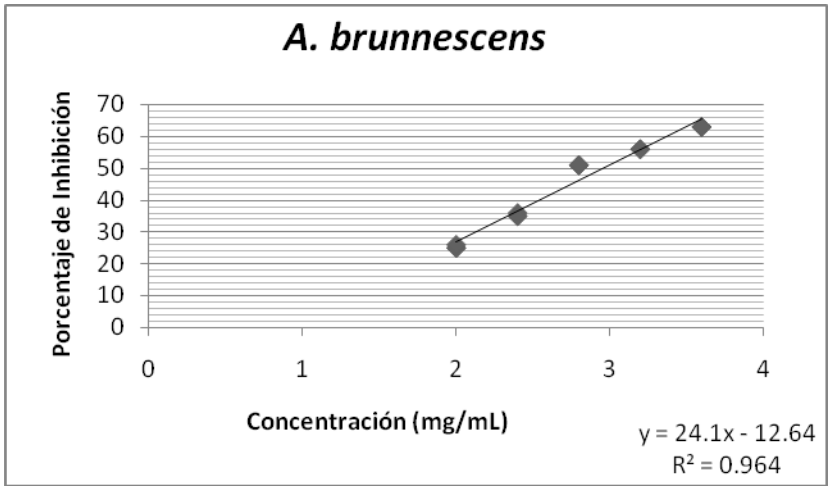




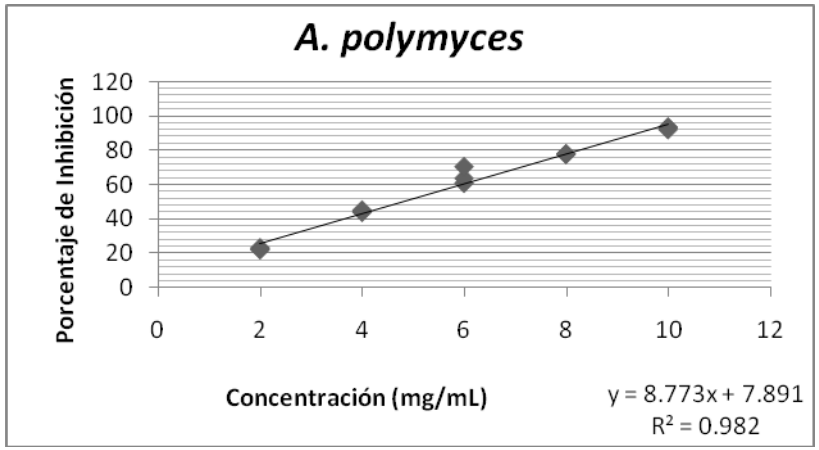


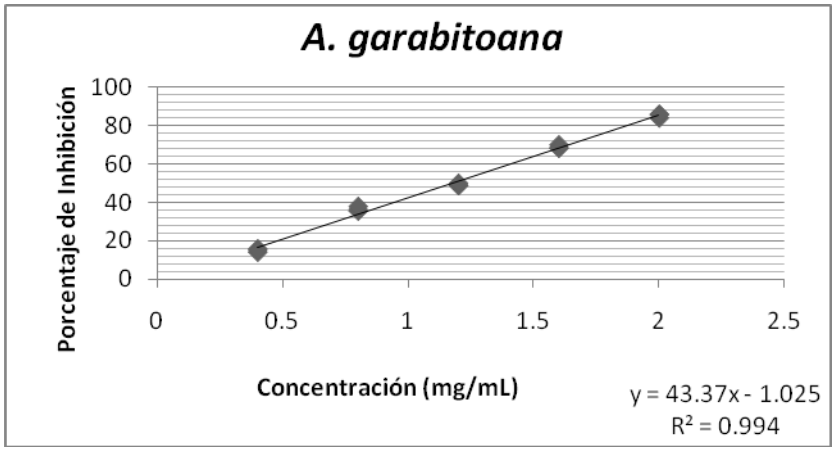
Fuente: Datos experimentales.



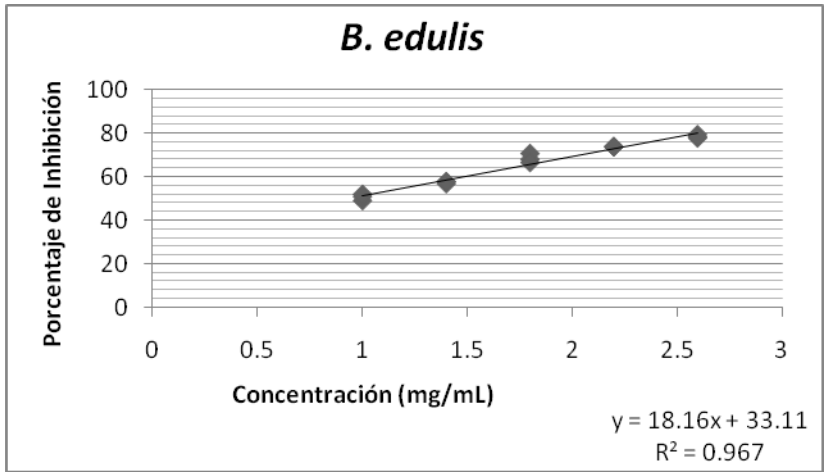


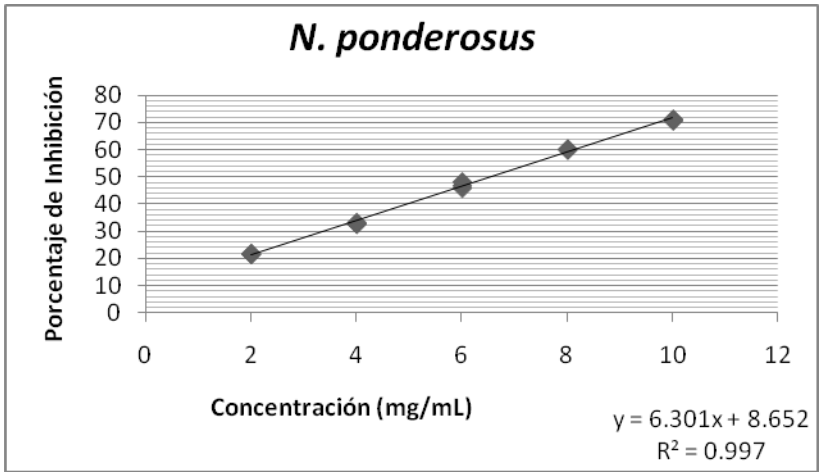
Anexo 16. Gráficas de concentración vrs. porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos por con el método DPPH de extractos acuosos.

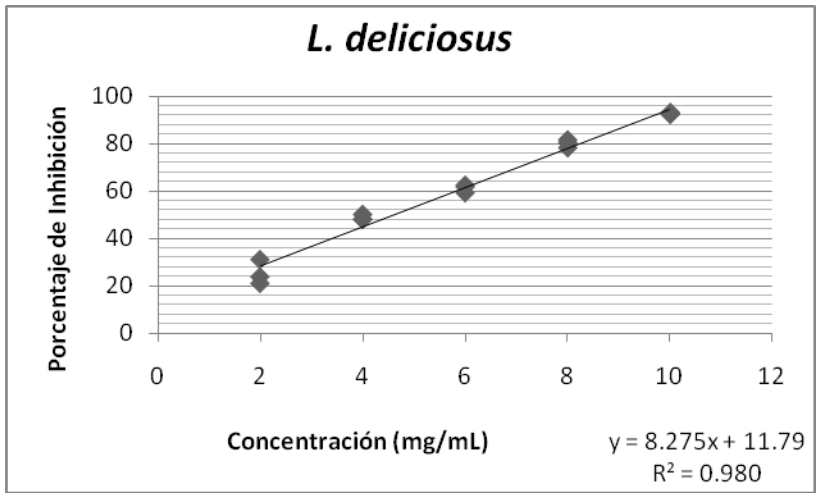


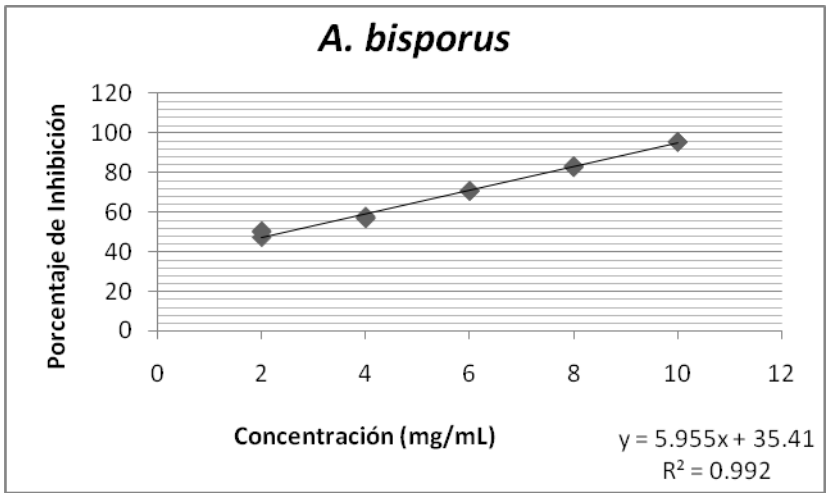


Fuente: Datos experimentales.

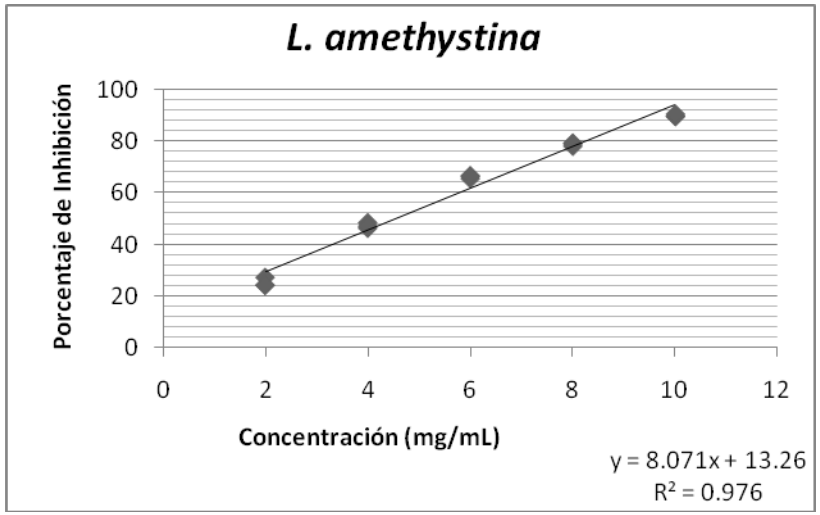


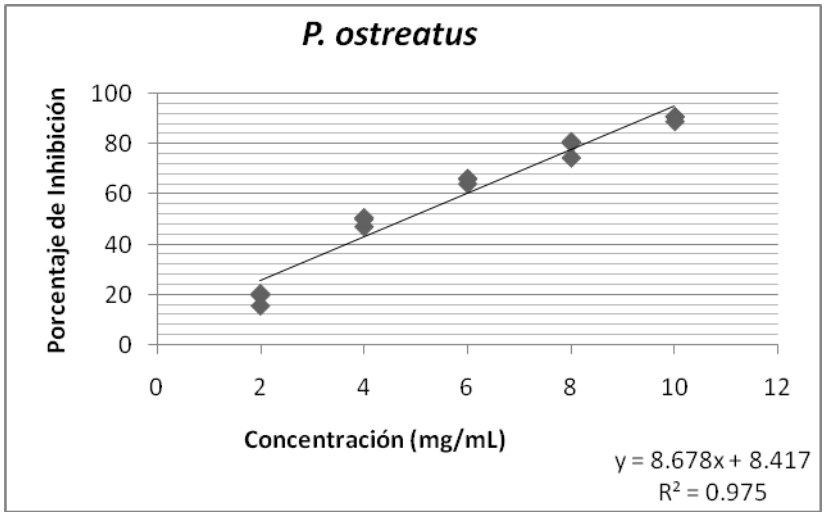


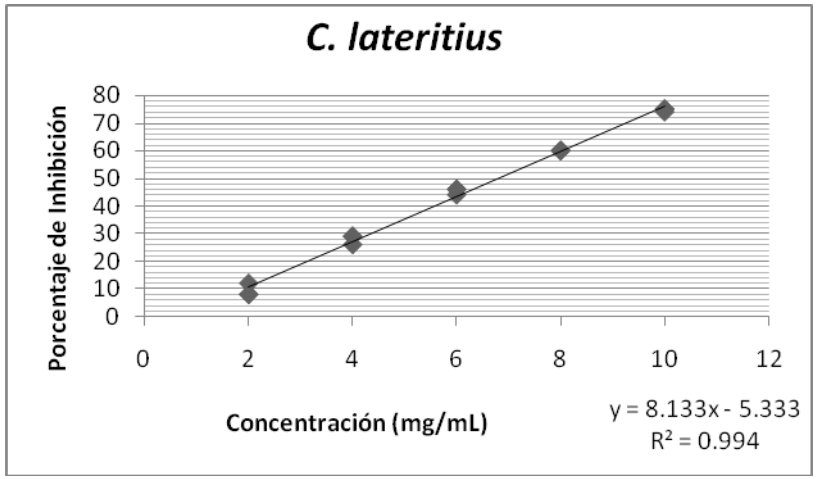


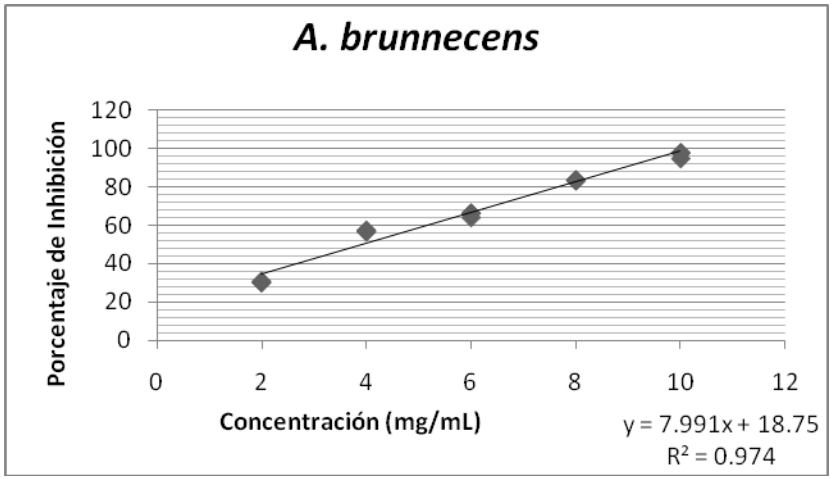


Fuente: Datos experimentales.



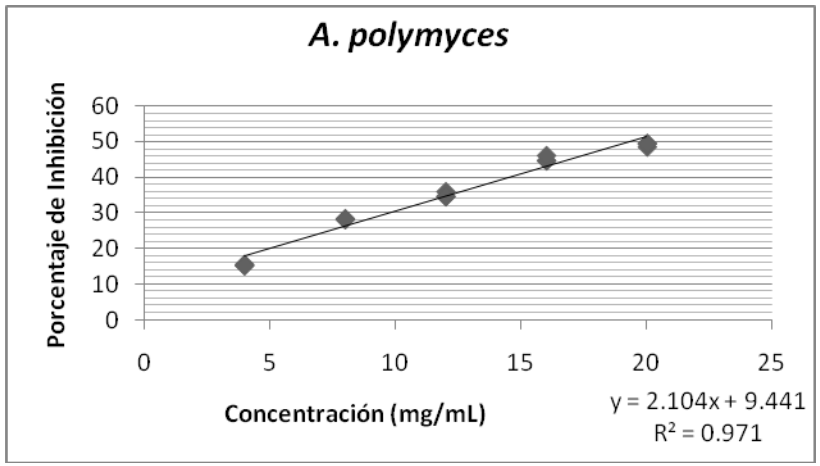


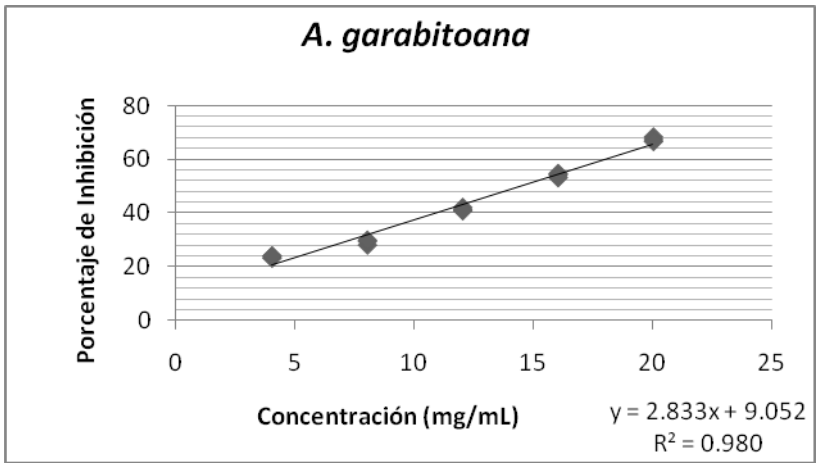


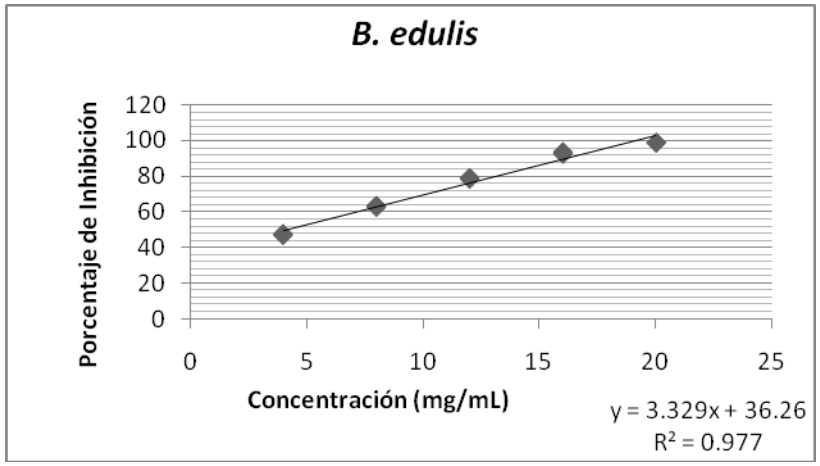


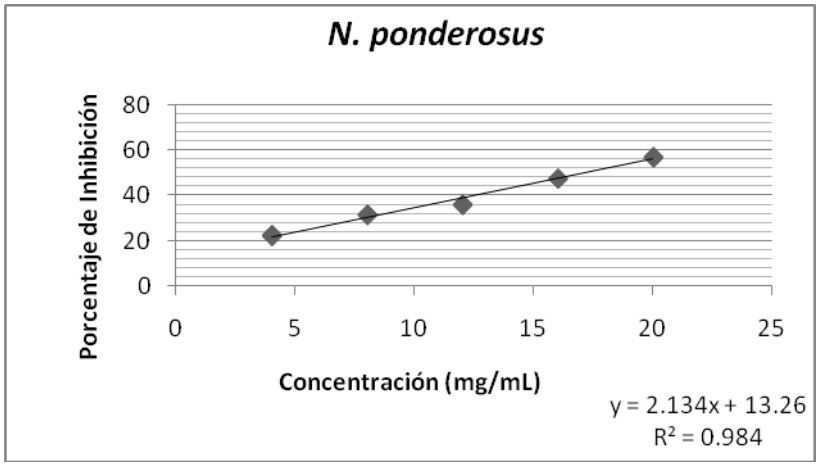
Fuente: Datos experimentales.

Anexo 17. Gráficas de concentración vrs. porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos por con el método ABTS de extractos etanólicos.

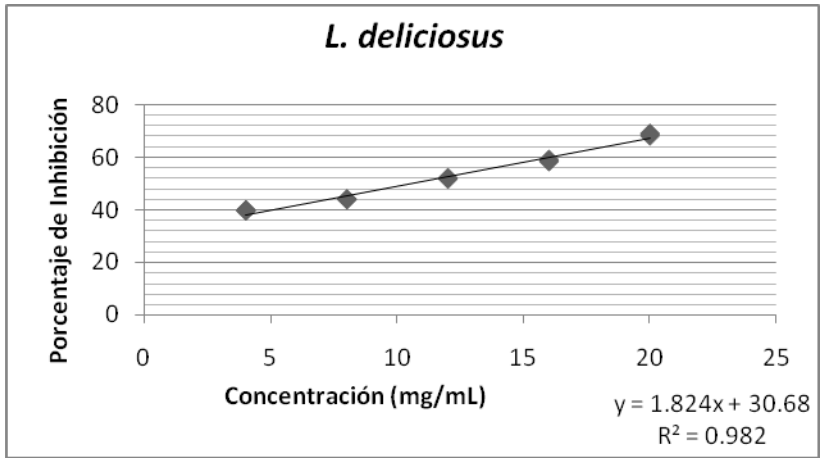


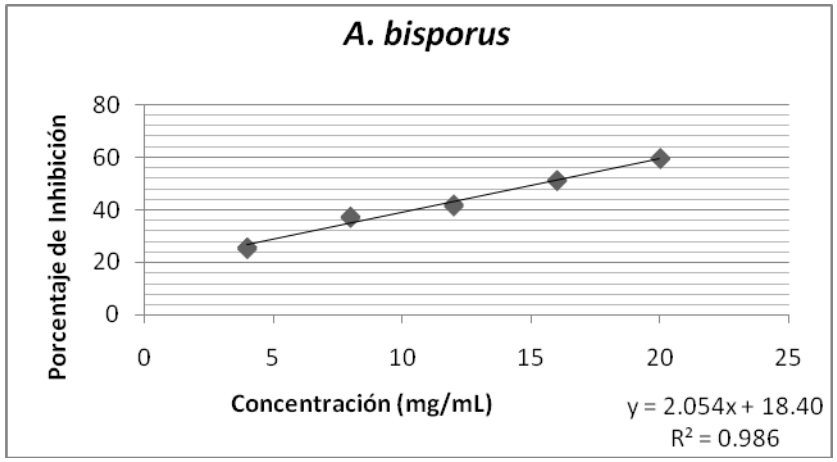


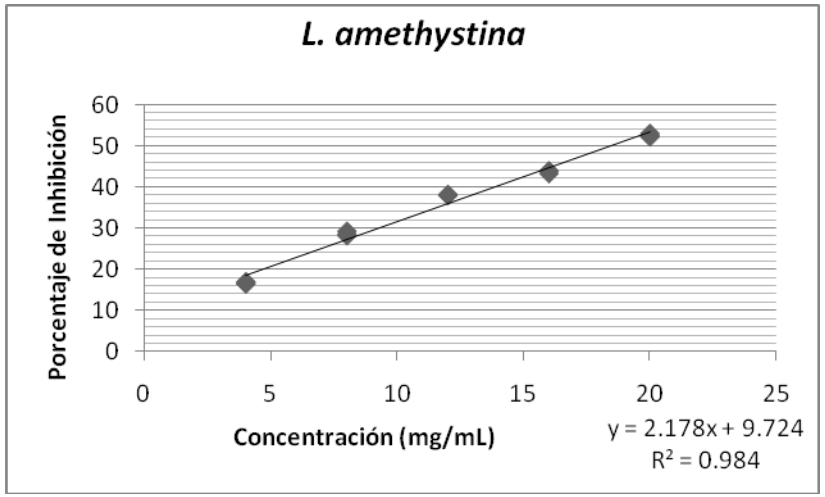


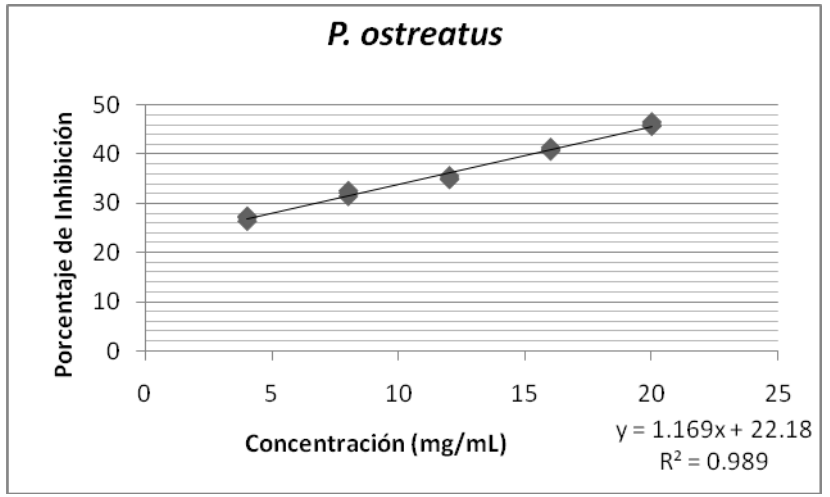


Fuente: Datos experimentales.

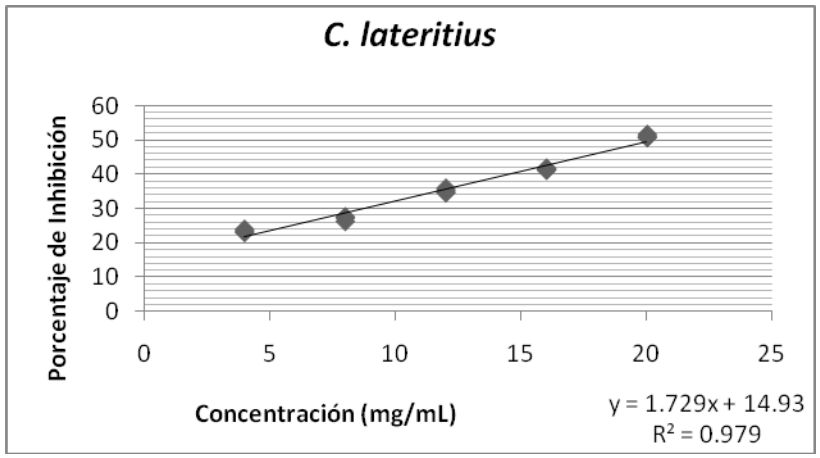


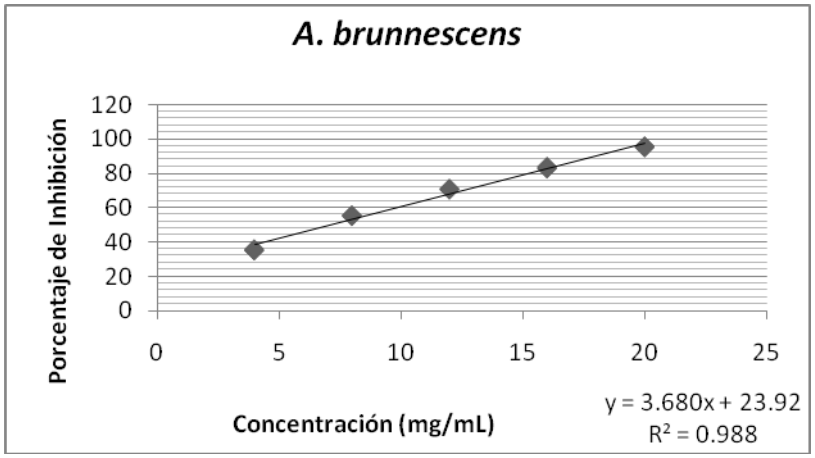




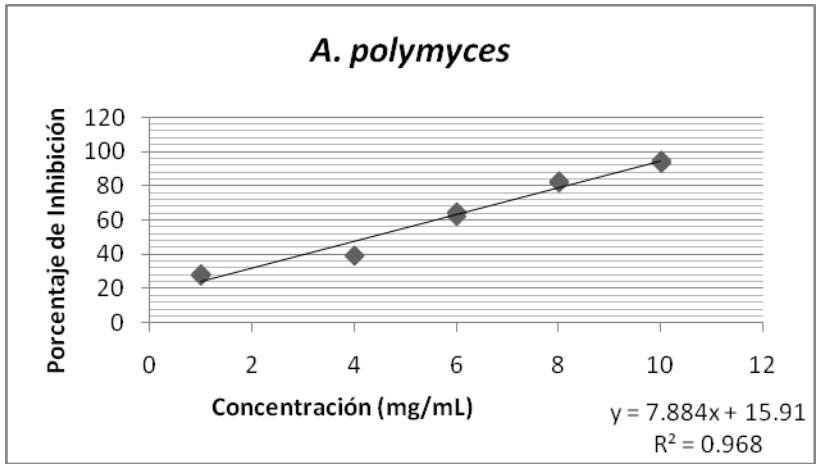


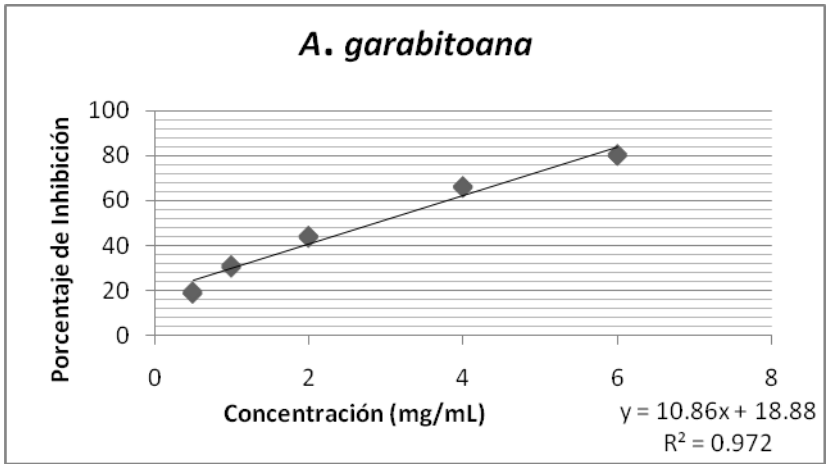
Fuente: Datos experimentales.



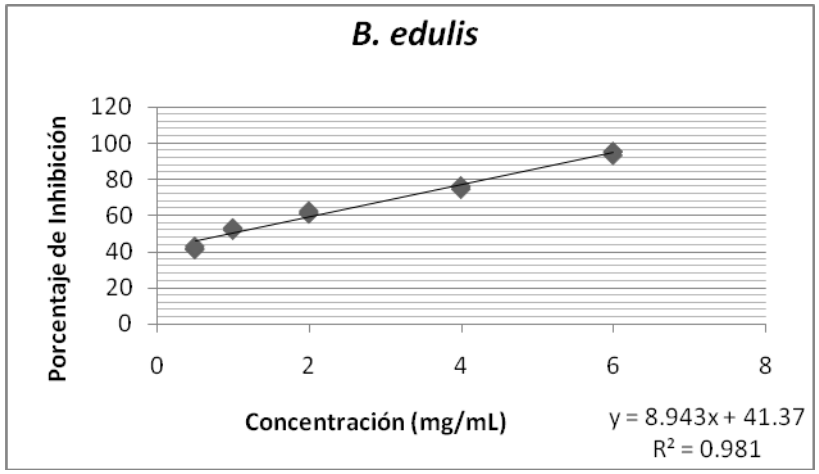


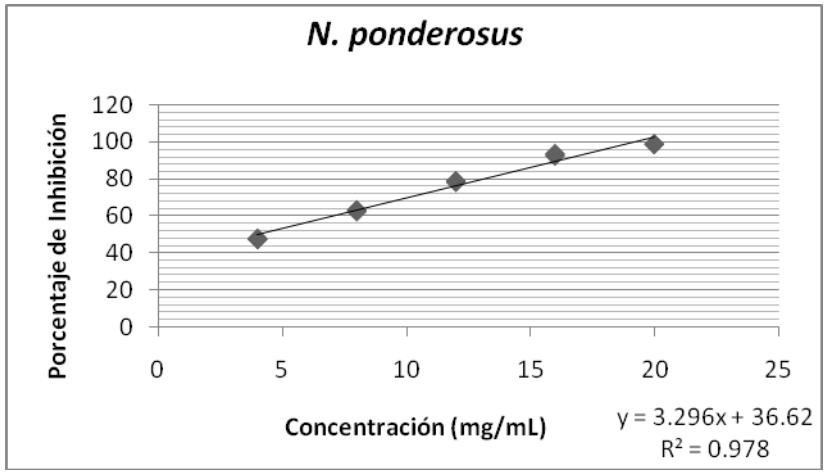
Anexo 18. Gráficas de concentración vrs. porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos por con el método ABTS de extractos acuosos.

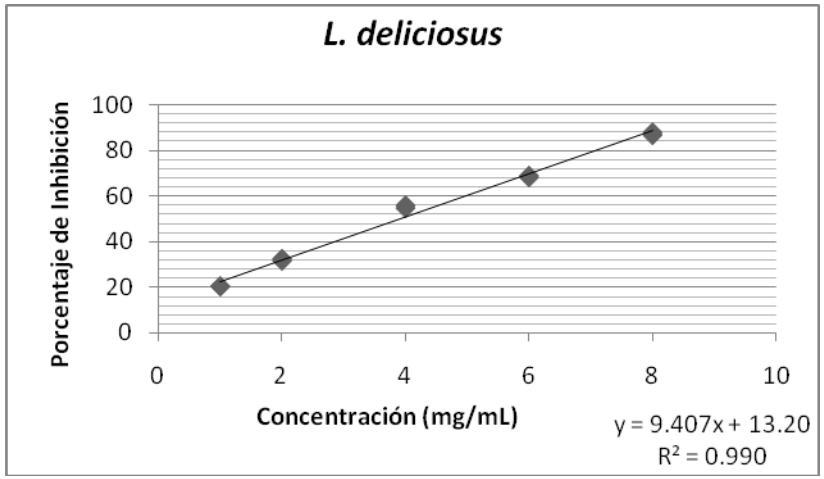


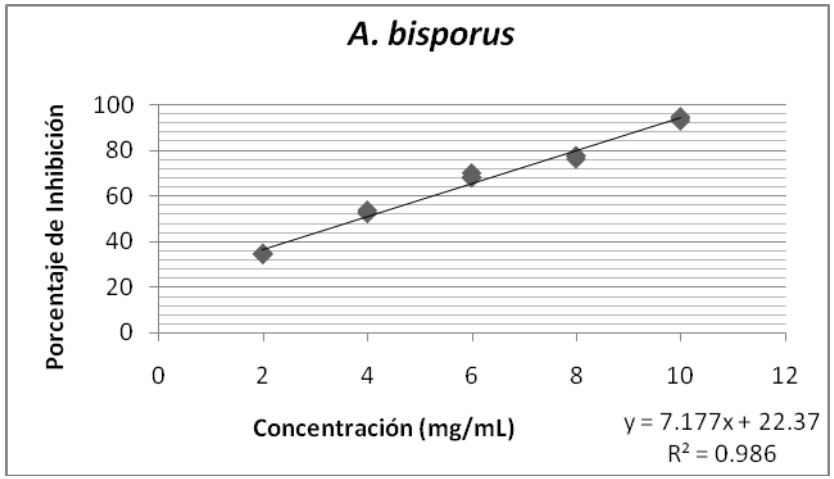


Fuente: Datos experimentales.

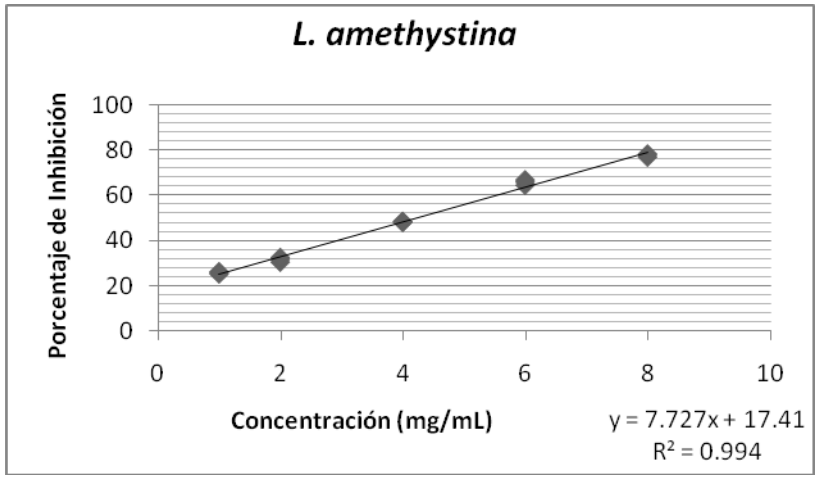


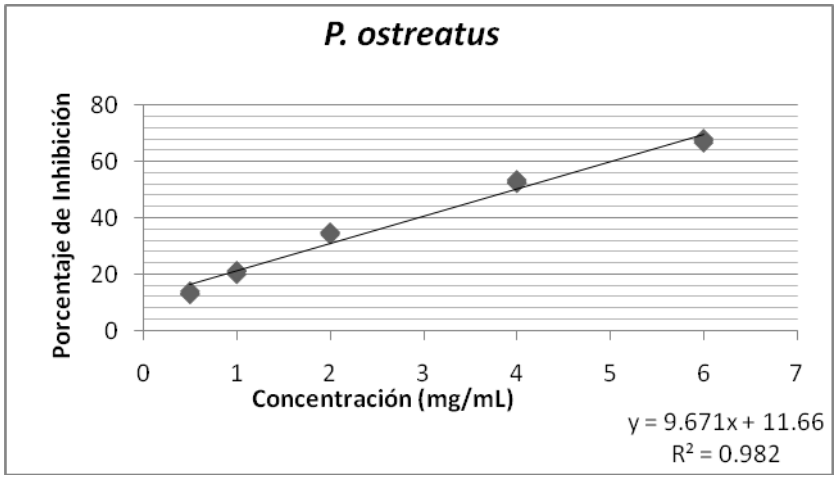


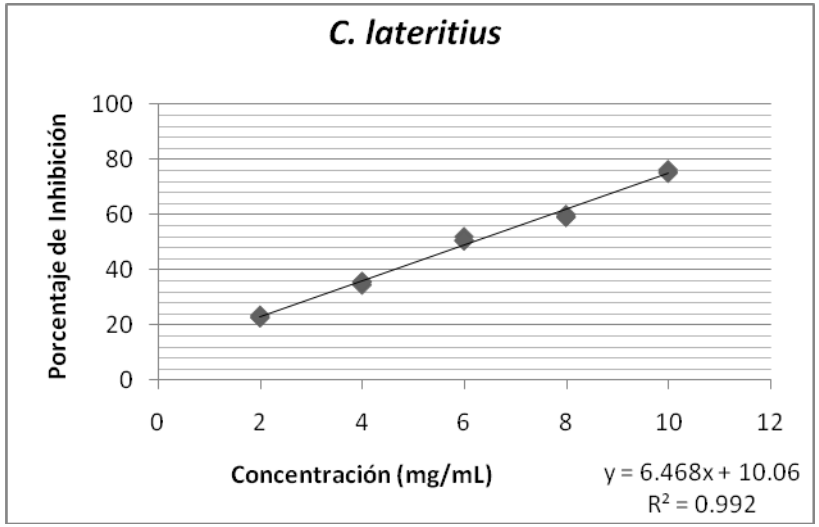


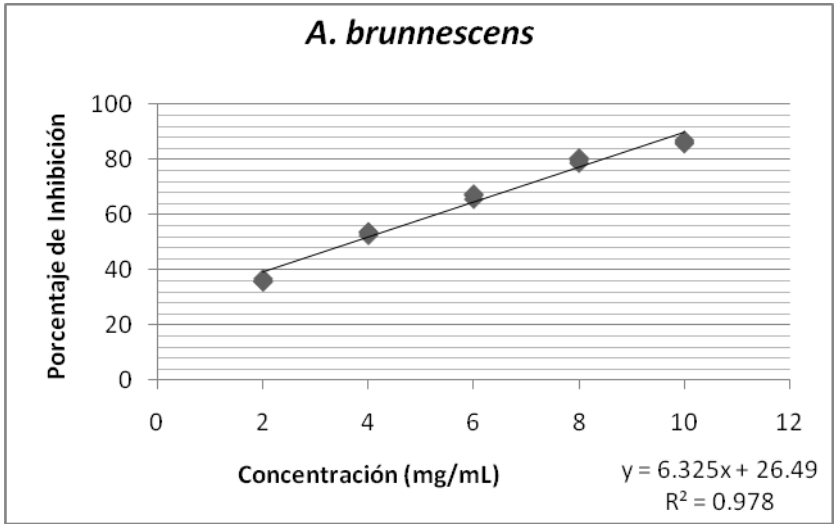


Fuente: Datos experimentales.



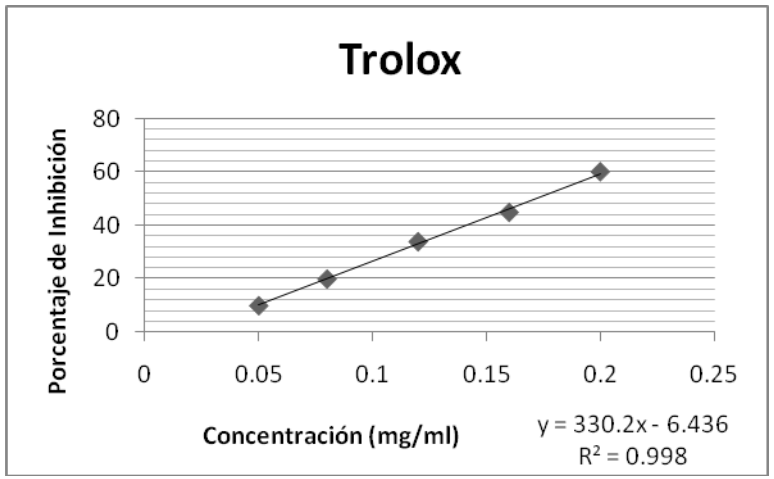


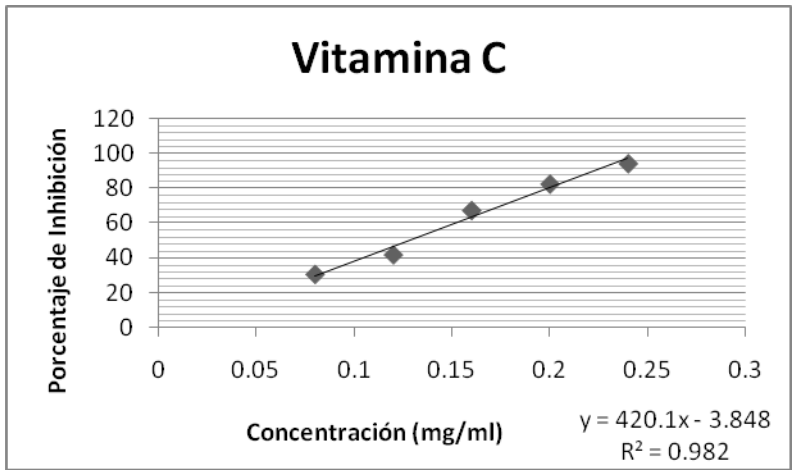


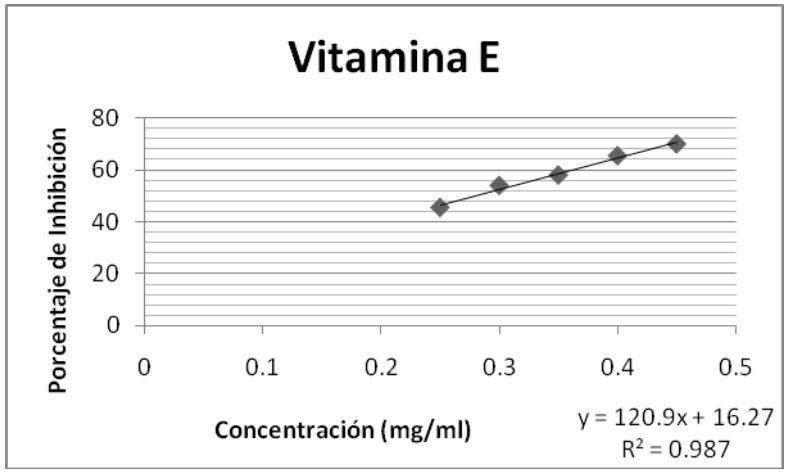


Fuente: Datos experimentales.

Anexo 19. Gráficas de concentración vrs. porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos con el método DPPH de los estándares.

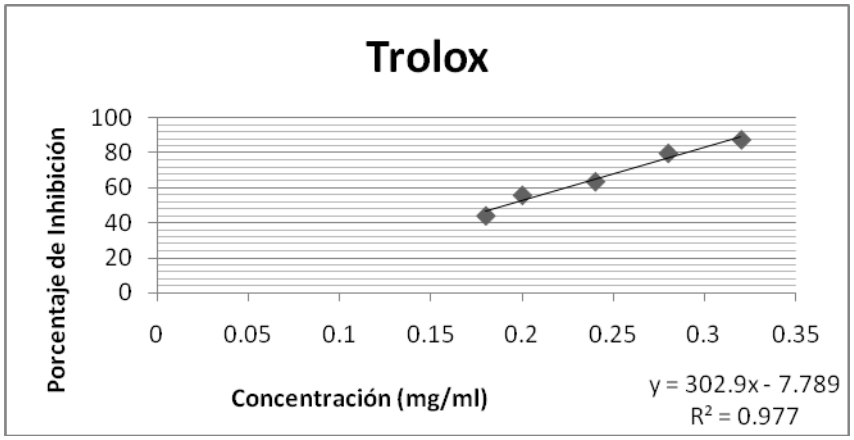


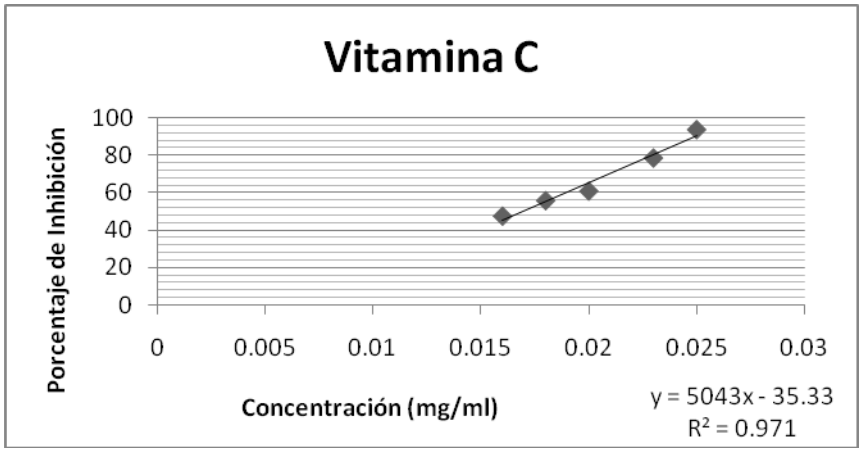


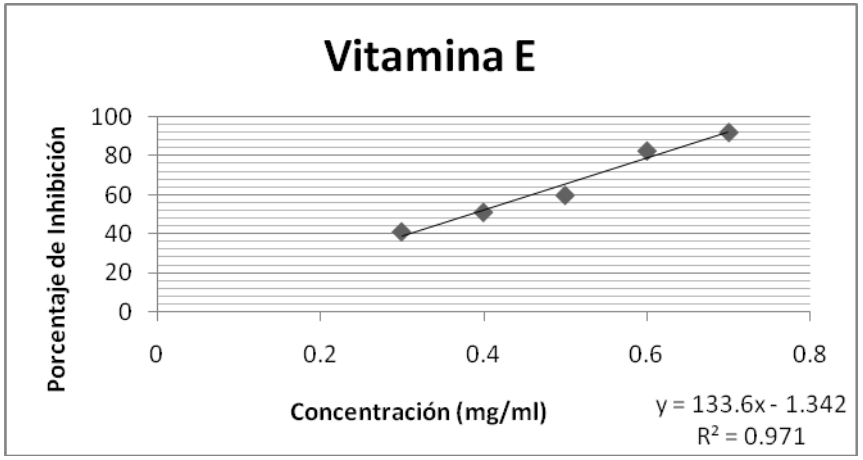


Fuente: Datos experimentales

Anexo 20. Gráficas de concentración vrs. porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos con el método ABTS de los estándares.







Fuente: Datos experimentales.

Karen Yesenia Belloso Rojas
Autora

Cynthia Ivonne González Cordón
Autora

Ana Rebeca Suárez Díaz
Autora

Lic. Armando Cáceres
Asesor y coordinador de proyecto

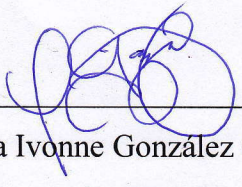
M.A. Margarita Paz de Ramírez
Revisora

M.A. María Eugenia Paredes Sánchez
Directora

Dr. Oscar Cóbar Pinto
Decano

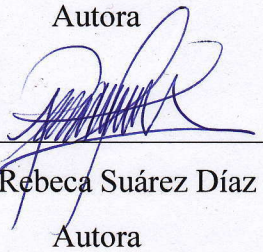
Karen Yesenia Belloso Rojas

Autora



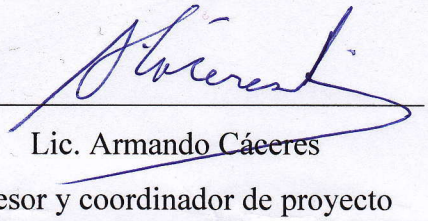
Cynthia Ivonne González Cordón

Autora



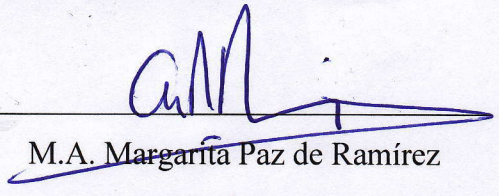
Ana Rebeca Suárez Díaz

Autora



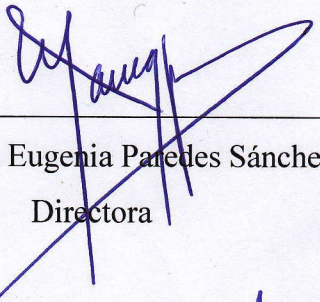
Lic. Armando Cáceres

Asesor y coordinador de proyecto



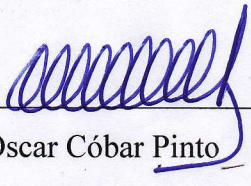
M.A. Margarita Paz de Ramírez

Revisora



M.A. María Eugenia Paredes Sánchez

Directora



Dr. Oscar Cóbar Pinto

Decano