



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

“Determinación de la actividad antioxidante de extractos de hongos *in vitro* y en alimentos”

TESIS

Que para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

LN. Salvador Ayala Cortés

Comité de Tutores

Tutor Académico

Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Tutor interno

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Externo

Dr. Mariano Martínez Vázquez.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 Aditivos alimentarios.....	5
1.2 Antioxidantes.....	6
1.3 Proceso de oxidación molecular	8
1.4 Consecuencias de la oxidación de los alimentos.	10
1.5 Mecanismo de acción de los antioxidantes en alimentos	10
1.6 Pruebas para detectar la actividad antioxidante “ <i>in vitro</i> ”.....	11
1.7 Hongos.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
5. JUSTIFICACIÓN.....	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS:	20
6.1 Diseño de Estudio.....	20
6.2 Criterios de inclusión y eliminación	20
6.3 Procedimientos	21
6.4 Prueba de Citotoxicidad en fibroblastos	24
6.5 Identificación de especies fúngicas activas	25
6.6 Análisis estadístico	25
6.7 Variables de Estudio.....	26
6.8 Implicaciones Bioéticas	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Artículo:.....	29
Actividad antioxidante de extractos orgánicos de hongos filamentosos. Ensayo en carne de pollo.....	29
8. DISCUSIÓN.....	48
9. CONCLUSIONES GENERALES	51
9.1 Limitaciones	52
9.2 Recomendaciones	52
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMEN

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte o que se adiciona a los alimentos para protegerlos de los efectos de los radicales libres generados por procesos químicos como la oxidación de aceites y grasas. De acuerdo con los estándares de la Unión Europea y de los Estados Unidos, el consumo de antioxidantes sintéticos rebasa los límites máximos recomendados. Estudios sugieren que el uso excesivo de antioxidantes sintéticos induce toxicidad pulmonar y una posible interrupción endocrina. Los hongos filamentosos son un extenso grupo filogenético con más de 1.5 millones de especies, producen diversos compuestos con potencial biotecnológico, entre los que se encuentran algunos antioxidantes como la Dihidroxiacetil piranona producida por la especie *Aspergillus candidus*. **Objetivo:** Evaluar la actividad antioxidante de extractos orgánicos de hongos filamentosos *in vitro* y en carne de pollo. **Métodos:** Se reactivaron 99 cepas de hongos filamentosos aislados del Estado de México, se obtuvo su extracto crudo en medio PDB y se avaluó su capacidad antioxidante mediante la técnica de oxidación del pirogalol. Los extractos que presentaron actividad fueron fraccionados en columnas Sep-Pack cartridge® de 6cc con hexano, acetona y metanol, las fracciones se evaluaron en carne de pollo por medio de la técnica TBARS. Se determinó la citotoxicidad de fracciones en fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™). Las cepas fúngicas activas fueron identificadas taxonómicamente mediante las guías de Watanabe, Barnett y Hunter. **Resultados:** Se reactivaron 99 cepas fúngicas y se obtuvo su extracto, 25 extractos presentaron actividad antioxidante (> 6%), 14 fueron los más activos con un porcentaje de inhibición de la oxidación >30%, de estos últimos se obtuvieron 39 fracciones: 14 de Hexano, 14 de Acetona y 11 de Metanol, de los cuales 28 fracciones presentaron inhibición de la oxidación (>32%). Las fracciones que presentaron una inhibición de la oxidación (TBARS) >40% en carne de pollo fueron: las fracciones de hexano de las cepas 57, 58 y 127, de acetona 10, 58, 118, y 304, de metanol 14, 58 y 304. Solo las fracciones de hexano de las cepas 58 y 127 no presentaron citotoxicidad (> 92% de viabilidad celular/200 mg/mL). Las cepas fúngicas que presentaron actividad antioxidante pertenecen a los géneros *Fusarium* (10), *Penicillium* (118), *Eudarluka* (127) y *Aspergillus* (304), las cepas 14, 57, 58 pertenecen a cepas fúngicas con micelio estéril. **Conclusión.** Los extractos y fracciones de diferente polaridad obtenidos de hongos filamentosos aislados del Estado de México presentan actividad antioxidante al inhibir la oxidación *in vitro* y en carne de pollo.

ABSTRACT

A dietary antioxidant is a substance that is part or that is added to food to protect them from the effects of free radicals generated by chemical processes such as the oxidation of oils and fats. According to the standards of the European Union and the United States, the consumption of synthetic antioxidants exceeds the recommended maximum limits. Studies suggest that excessive use of synthetic antioxidants induces lung toxicity and possible endocrine disruption. Filamentous fungi are an extensive phylogenetic group with more than 1.5 million species, producing various compounds with biotechnological potential, among which are some antioxidants such as Dihydroxymethyl pyranone produced by the *Aspergillus candidus* species. **Objective:** Evaluate the antioxidant activity of organic extracts of filamentous fungi in vitro and in chicken meat. **Methods:** 99 strains of filamentous fungi isolated from the State of Mexico were reactivated, their crude extract was obtained in PDB medium and its antioxidant capacity was assessed by the pyrogallol oxidation technique. The extracts that presented activity were fractionated in 6cc Sep-Pack cartridge® columns with hexane, acetone and methanol, the fractions were evaluated in chicken meat by means of the TBARS technique. The cytotoxicity of fractions in mouse fibroblasts (NIH / 3T3 (ATCC® CRL-1658™)) was determined. The active fungal strains were taxonomically identified by the Watanabe, Barnett and Hunter guidelines **Results:** 99 fungal strains were reactivated and their extract was obtained, 25 extracts presented antioxidant activity (> 6%), 14 were the most active with a percentage of oxidation inhibition >30%, of which the latter obtained 39 fractions, of which 28 fractions showed oxidation inhibition (>32%). The fractions that exhibited a >40% oxidation inhibition (TBARS) in chicken meat were: the hexane fractions of strains 57, 58 and 127, of acetone 10, 58, 118, and 304, of methanol 14, 58 and 304. Only the hexanic fractions of strains 58 and 127 did not show cytotoxicity, having a cell viability >92% (200 mg / mL). The fungal strains that presented antioxidant activity belong to the genera *Fusarium* (10), *Penicillium* (118), *Eudarluka* (127) and *Aspergillus* (304), strains 14, 57, 58 belong to fungal strains with sterile mycelium **Conclusion.** Extracts and fractions of different polarity obtained from asylum filamentous fungi of the State of Mexico have antioxidant activity by inhibiting oxidation in vitro and in chicken meat.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aditivos alimentarios

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)¹ define un aditivo alimentario como *“una sustancia que no es consumida como alimento por sí mismo y que normalmente no se utiliza como un ingrediente típico de la comida, tenga o no un valor nutritivo, la adición intencional de estos en los alimentos es con un fin tecnológico”*.

Para la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos de América² (Food and Drug Administration, FDA) un aditivo alimentario es *“cualquier sustancia cuyo uso previsto resulta o puede esperarse razonablemente que resulte, directa o indirectamente, en que se convierta en un componente o que afecte a las características de cualquier alimento”*, esto puede incluir a cualquier sustancia usada en la producción, procesamiento, tratamiento, empaquetamiento, transporte o vida de anaquel.

Los aditivos alimentarios son ingredientes que se agregan a los productos procesados y en producción, para incrementar el valor nutritivo, la preservación de los alimentos y mejorar las propiedades sensoriales³.

1.1.1 Tipos de aditivos alimentarios

De acuerdo con la FDA², entre los aditivos alimentarios más comunes, se encuentran:

- **Conservadores de alimentos:** previenen el deterioro de los alimentos provocado por microorganismos y retardan o inhiben el cambio de coloración, la textura o retrasan la oxidación.
- **Edulcorantes:** Sustancia natural o sintética que puede sustituir parcial o totalmente el dulzor del azúcar.
- **Colorantes:** Sustancias que compensan la pérdida de color debido a la temperatura, luz, aire, humedad y condiciones de almacenamiento.
- **Saborizantes:** Sustancias que agregan sabores naturales y sintéticos a los alimentos.
- **Potenciadores de sabor:** Sustancia o mezcla de sustancias destinadas a realzar los aromas o sabores de los alimentos.
- **Sustituto de grasa:** Sustancia que provee una textura cremosa, en alimentos reducidos en grasa.

- **Nutrimentos:** Reemplazo de vitaminas o minerales que son perdidos en el procesamiento o cocción de los alimentos (enriquecimiento) o agregado algunos que pueden hacer falta en la dieta (fortificación).
- **Emulsificantes:** Sustancias que evitan la separación de los ingredientes previamente mezclados, haciendo estable la emulsión, y evitando que los productos se disuelvan más fácilmente.
- **Humectantes:** Sustancia o mezcla de sustancias que ayudan a prevenir la pérdida de humedad en los productos.
- **Antioxidantes:** Sustancias o mezclas de sustancias destinadas a retardar o impedir la oxidación y que produce la rancidez del alimento.

1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas capaces de donar hidrógenos (electrones) que reaccionen con los radicales libres, así como con otras especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta forma disminuir o retardar el proceso de oxidación^{4,5}. A nivel celular, los radicales libres (R^{\cdot}) causan oxidación en las proteínas, asimismo inducen peroxidación lipídica en la membrana celular, causando la ruptura de la membrana, retroalimentando el estrés celular. Además la oxidación puede ocurrir en la membrana de los organelos, especialmente en la membrana mitocondrial que a su vez provocaría muerte celular⁶. Los compuestos antioxidantes pueden funcionar como aditivos que preservan los alimentos y previenen el deterioro del producto durante el procesamiento o la vida útil del alimento⁶. Los antioxidantes pueden minimizar y retardar la rancidez de los lípidos presentes en los alimentos, sin provocar algún daño a las propiedades sensoriales (color, textura, sabor y aroma) o nutricionales del alimento^{4,7}. Los antioxidantes pueden ser categorizados como naturales y sintéticos⁸:

1.2.1 Antioxidantes naturales

Entre los antioxidantes naturales se encuentran los que se derivan de las plantas como polifenoles y fitoestrógenos, así como algunas vitaminas tales como retinol y tocoferoles⁹. Entre los polifenoles, se encuentran los flavonoides, como las antocianidinas presentes en *Fragaria* (fresa); las catequinas presentes en *Camellia sinensis* (té verde y negro); los citroflavonoides presentes en la *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus limón* (limón) y *Citrus paradisi* (toronja); protoantocianidina presente en la *Vitis vinífera* (uva); además de los taninos y polifenoles que se encuentran en el vino. Entre los fitoestrogenos se encuentran isoflavonas, lignanos, y flavonoides, presentes en la *Glycine max* (soya)⁹. Además, se

encuentran algunos compuestos presentes en la dieta como la Vitamina E en: *Persea americana* (aguacate), aceite de oliva y *Oryza sativa* (arroz); Vitamina A presente en *Spinacia oleracea* (espinaca), *Daucus Carota* (zanahoria), *Mangifera indica* (mango), *Cucumis melo* (melón); Vitamina C presente en: *Beta vulgaris* (acelgas), *Psidium guajava* (guayaba), *Actinidia chinensis* (kiwi), *Solanum lycopersicum* (tomate), estos últimos también tienen un antioxidante llamado licopeno⁹.

1.2.2 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son entre otros, el palmitato ascórbico, estearato ascórbico, glicina, octil galato, propil galato (PG), terbutil hidroquinona (TBHQ), Butil hidroxitolueno (BHT) y el Butil hidroxibutilanisol (BHA); estos dos últimos son agregados a los aceites vegetales para retardar la oxidación (degradación) durante el almacenamiento o al momento de freír; sin embargo, estos compuestos no proveen la protección suficiente para los alimentos durante estos procesos^{10,11}. Además de los aceites vegetales, los antioxidantes sintéticos como el TBHQ, BHA, BHT, y el PG son agregados a carnes frescas, y son utilizados en diferentes concentraciones que dependen del peso de los alimentos, por ejemplo se agrega 0.01% cuando solo es un antioxidante o se puede agregar hasta 0.02% cuando hay una combinación de antioxidantes¹².

Se ha reportado que el antioxidante sintético BHA se elimina rápidamente, aunque puede permanecer en los tejidos a largo plazo; sin embargo, el BHT se mantiene durante más tiempo en el organismo gracias a la circulación entero-hepática. Por esta razón el antioxidante BHT permanece durante más tiempo en el organismo¹³, además algunos estudios sugieren que BHT induce toxicidad pulmonar y desarrollo de células tumorales pulmonares en ratones¹⁴. Estudios realizados por Pop *et al.* (2018)¹⁵, sugieren una posible interrupción endocrina en las líneas celulares T47D-Kbluc, MCF-7.

De acuerdo con los estándares de la Unión Europea y los Estándares Nacionales de Alimentos de los Estados Unidos (National Food Standards)¹⁶⁻¹⁸, el consumo de antioxidantes sintéticos rebasa los límites máximos recomendados. El consumo conjunto de productos como la margarina, lácteos y goma de mascar, en un periodo corto de tiempo, puede llegar a rebasar los límites recomendados de la ingestión diaria recomendada¹⁶. Por esto es importante que estos aditivos (antioxidantes sintéticos) no presenten ningún riesgo.

1.3 Proceso de oxidación molecular

El oxígeno molecular en concentraciones normales es inofensivo para los organismos, además de ser esencial para la obtención de energía en el metabolismo celular; sin embargo algunas Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que son derivadas durante el metabolismo aeróbico o de las condiciones ambientales (como contaminación, humo y radiación)¹⁹, son considerados productos indeseables del metabolismo⁸. Químicamente las ROS exhiben electrones desapareados en diferentes orbitales de mayor energía, haciéndolos susceptibles a la formación de radicales libres; estos radicales libres son altamente reactivos^{19,20}. Las ROS en organismos vivos y en condiciones normales influyen positivamente en el metabolismo, la defensa inmunitaria y los procesos celulares. Pero si se alteran estas condiciones pueden promover efectos patológicos en el organismo como²¹: daños estructurales en las membranas celulares hasta la destrucción de las mismas, además de mutaciones del ácido desoxiribonucleico (ADN), que pueden desencadenar arterioesclerosis, cáncer y diabetes *mellitus*^{9,22}. También inducen alteraciones en la membrana interna y el ADN mitocondrial que conlleva a una mayor producción de radicales libres de oxígeno, que consecuentemente aumentan el estrés oxidante, produciendo más oxidantes y perdiendo la homeostasis celular⁹. Cuando las ROS se encuentran en mayor concentración, esta homeostasis puede ser alterada, resultando en un estrés oxidativo que tiene un papel importante en enfermedades crónicas²³. Los antioxidantes endógenos favorecen el mantener el equilibrio en las ROS, aunque los antioxidantes endógenos no son eficientes cuando interactúan con altas cantidades de ROS²¹.

1.3.1 Estrés oxidante

El equilibrio de óxido-reducción en el organismo humano es mantenido por un complejo mecanismo regulatorio; algunos estímulos físicos (radiación, consumo de alcohol, tabaco y ejercicio), generan un cambio en el equilibrio hacia la oxidación, esto induce al estrés oxidante²⁴. El estrés oxidante se puede definir como el desequilibrio en el sistema prooxidante-antioxidante en favor de los oxidantes²⁴. Este desequilibrio es seguido por una alteración en el control oxidante, provocando daño celular²⁵ El daño generando induce una respuesta fisiológica del organismo donde intenta contener con reacciones de reducción para tratar de disminuir la oxidación y restaurar la homeostasis²⁶ mediante mecanismos eficientes tales como la producción de antioxidantes que disminuyan los niveles de prooxidantes, por ejemplo el NAD, glutatión S transferasa, quinona reductasa, glutamato cisteína ligasa²⁷.

El daño oxidante se refiere a las modificaciones en moléculas como lípidos, DNA y proteínas²⁸ presentes en las células conduciendo a la pérdida de la función celular²⁹. Estudios previos sugieren que el estrés oxidante crónico está relacionado con la progresión de varias enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y desórdenes neurológicos²⁴.

1.3.2 Proceso de oxidación en alimentos

Los radicales libres reaccionan rápida e indiscriminadamente con todos los tipos de biomoléculas como los hidratos de carbono, proteínas y lípidos presentes en las células de los tejidos de alimentos, causando daños como despolimerización de polisacáridos, inactivación de enzimas y proteínas estructurales y la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados^{19,29,30}. Estos radicales catalizan la reacción de auto oxidación, provocando una reacción en cadena³¹. En este proceso, el oxígeno reacciona con los ácidos grasos insaturados creando más radicales libres, ya que los ácidos grasos insaturados son más susceptibles a la oxidación³². Los radicales libres derivados del oxígeno no requieren de otros radicales que reaccionen con ellos, ya que reaccionan directamente con las dobles ligaduras de las grasas insaturadas. Los lípidos están dispuestos en un estado de equilibrio, sin embargo, la luz y el calor, favorecen la formación de radicales libres (oxígeno singlete)³¹.

En los productos cárnicos la oxidación se debe a su naturaleza, ya que hay presencia de radicales libres, desde atmosféricos como algunos generados en el mismo tejido que producen una reacción en cadena que genera el deterioro del producto. En los productos cárnicos derivados de los peces, este efecto, es aún mayor, ya que en los peces se encuentra un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados como el eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) que tienen mayor predisposición a la oxidación debido al alto contenido de estos ácidos grasos³².

Dentro de los ROS que reaccionan con las biomoléculas presentes en alimentos, específicamente con algunos lípidos, se encuentran el oxígeno triplete y el oxígeno singlete que se caracterizan por tener desapareados los electrones que se encuentran en el último orbital de energía y que actúan como radical que promueve la auto oxidación. El oxígeno singlete, reacciona directamente con los dobles enlaces de los aceites insaturados³¹. Además la oxidación en alimentos provoca la formación de un mal sabor, disminución de la textura y la jugosidad³⁰; por ejemplo, se ha descrito que en ambientes oxidantes, disminuye la suavidad de los cortes de carne de cerdo³³.

1.4 Consecuencias de la oxidación de los alimentos.

Los alimentos con mayor contenido de lípidos, como la carne proveniente del pescado, son altamente vulnerables a la oxidación debido al alto contenido de ácidos grasos¹⁰. La resistencia de un aceite a la oxidación se encuentra en función a la cantidad de insaturaciones en la cadena, ya que, los aceites con mayor cantidad de dobles enlaces en su cadena tienden a oxidarse con mayor facilidad, en comparación con los ácidos grasos, con menor cantidad de insaturaciones. Esto puede promover modificaciones significativas en la composición de los ácidos grasos, reduciendo el contenido de insaturaciones^{10,34}. Además, las proteínas de los alimentos pueden ser degradadas (desnaturalizadas) mediante la auto oxidación, la acción microbiana y la interacción con compuestos resultantes de la oxidación de los lípidos como el peróxido³⁵.

1.5 Mecanismo de acción de los antioxidantes en alimentos

El uso de antioxidantes para la preservación de los alimentos es indispensable, porque con ello se asegura su calidad, ya que mantiene la apariencia, color y olor para el consumidor⁹. Los compuestos antioxidantes son sustancias que pueden reaccionar con radicales libres o bien reducen su reactividad⁵; esto último es aprovechado por la industria alimentaria. Un antioxidante dietético es una sustancia que es adicionada o que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano, que previene los efectos adversos de ROS sobre las funciones fisiológicas normales⁹, al proteger los alimentos de la rancidez y decoloración ocasionadas por los radicales libres generados por procesos químicos como la oxidación de aceites y grasas^{9,11}.

En ciencias de los alimentos los materiales más protegidos contra la oxidación son los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, y en menor medida las moléculas orgánicas que componen los tejidos vegetales y animales⁵. La oxidación de los aceites vegetales es el mayor reto para la industria alimentaria, ya que al oxidarse disminuye la calidad del producto y con ello se generan pérdidas económicas¹⁰.-De acuerdo con su mecanismo de acción, los antioxidantes pueden clasificarse en 5 grupos³⁶:

- **Barrido de radicales:** frenan la cadena de propagación de radicales.
- **Queladores:** complejos con metales que inhiben la iniciación de la formación de radicales.
- **Extintores:** desactivan la alta energía de las especies reactivas de oxígeno.
- **Removedores de oxígeno:** Eliminan el oxígeno del medio previniendo de esta manera su oxidación.

- **Regeneradores de antioxidantes:** reconstituyen otros antioxidantes presentes en los alimentos cuando se convierten en radicales.

1.6 Pruebas para detectar la actividad antioxidante “*in vitro*”

Se encuentran diversas técnicas para determinar la capacidad de oxidación, entre las que se encuentran DPPH, ABTS, FRAP, blanqueamiento con β Carotenoides y auto-oxidación del pirogalol:

1.6.1. Prueba mediante la utilización de DPPH

Este método es para determinar la capacidad antioxidante de extractos naturales utilizando el compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)^{5,37}. Este método se fundamenta en la reacción potencial del antioxidante mediante un color radical persistente DPPH o con la oxidación⁵. Los antioxidantes comúnmente usados en la industria alimentaria son el BHT y el ácido ascórbico, que también son utilizados como compuestos de referencia para estudios comparativos³⁸. La búsqueda, caracterización y aplicación de los antioxidantes naturales es punto de atención a equipos de investigación alrededor del mundo³⁹.

1.6.2 Prueba mediante la utilización de ABTS

Es una reacción donde el antioxidante dona electrones (actúa como reductor) y se mide la capacidad de los antioxidantes para capturar el catión ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS); la reducción de este compuesto disminuye la absorbancia de 820 a 658nm. El radical es generado con peróxido de hidrógeno que oxida la metamioglobina y a su vez el reactivo ABTS. Sin embargo, algunos polifenoles pueden interactuar con los reactivos y a su vez sobreestimar la concentración del compuesto antioxidante^{40,41}.

1.6.3. Prueba mediante la utilización de FRAP

La prueba de Poder Antioxidante de Reducción de Hierro (Ferring Reducing Antioxidant Power, FRAP), es un método colorimétrico que mide la reducción de hierro plasmático, utilizando los antioxidantes por su efecto reductor. Se reduce un complejo de ferric-tripiridil-triazina (Fe (III)-TPTZ) en un medio ácido a Fe(II) (Fe(III) \rightarrow Fe(II)), con un intenso color azul que, es medido a una absorbancia 593nm durante 30 minutos. El antioxidante

favorece la reacción de reducción del complejo, el antioxidante utilizado habitualmente en estas pruebas es el ácido ascórbico, sin embargo, se toma como equivalencias de Trolox para las mediciones^{41,42}.

1.6.4 Prueba de blanqueamiento con β Carotenoides (bleaching assay)

Esta prueba también conocida como “*bleaching assay*”, se basa en un mecanismo de oxidación (decoloración) un compuesto derivado de los carotenoides (crocina), generado por radicales de peróxido. Este método se mide por absorbancia a 434nm, pero la tasa de decoloración y los resultados son expresados en forma de equivalentes de Trolox^{41,43}.

1.6.5 Método de auto-oxidación del pirogalol.

El método de auto-oxidación del pirogalol, (1,2,3 benceno triol) fue diseñado principalmente para detectar superoxi dismutasa, sin embargo, en recientes décadas ha sido utilizado para la detección de otros antioxidantes por ejemplo polifenoles, taninos, flavonoides y antocianinas. Los antioxidantes que cuya estructura contienen ácidos carboxílicos, ésteres o grupos lactonas, son recomendados para esta metodología^{44,45}. El pirogalol es conocido por su rápida autooxidación, especialmente en una solución alcalina. La enzima superóxido dismutasa, dismuta univalentemente reduciendo el oxígeno a un radical anión superóxido. La oxidación es medida por la absorbancia que va aumentando en medición de 420nm y el consumo de oxígeno también va en aumento en función del tiempo⁴⁶.

1.6.6 Medición de la actividad antioxidante mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS)

La oxidación de lípidos provoca una reacción en cadena que genera muchos productos finales, uno de ellos es el malonaldehído (MDA) que es asociado con mal aspecto de los alimentos cárnicos. El método más común para detectar MDA es por medio de la reacción del MDA con ácido tiobarbitúrico(TBA), que resulta en la condensación de dos moléculas de TBA con una molécula de MDA y la probable eliminación de dos moléculas de agua, evidenciado por el cambio de color en un tono rosado^{47,48}. El método de Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS derivado de las siglas tiobarbituric acid reactive substances), es considerado como un marcador estándar de una peroxidación lipídica inducida por estrés oxidativo⁴⁹.

La producción de TBARS ocurre en varios escenarios de la oxidación de los lípidos, desde que comienza la cadena de auto-oxidación en el sustrato, o al reaccionar con los radicales libres permitiendo la formación del MDA. El ensayo de TBARS no indica el mecanismo de acción de los antioxidantes, si no su efectividad, al evidenciar la presencia o ausencia del MDA en el sustrato⁴⁸.

1.7 Hongos

El reino fungí es un amplio y diverso grupo de organismos en el que se encuentran mohos, hongos y levaduras. La mayoría de los hongos son microscópicos y habitan en el suelo o en material en descomposición⁵⁰, estos organismos son heterótrofos, ya que para cubrir sus necesidades nutricionales y energéticas requieren de moléculas de carbono preformadas producidas por otros organismos⁵¹ juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la biosfera, ya que son los principales descomponedores de la materia orgánica, permitiendo así completar el ciclo de la materia y de la energía⁵². Su alimentación consiste en la infiltración a una fuente alimenticia y segregan enzimas digestivas en ella, para descomponer las moléculas complejas en compuestos más pequeños y así poder integrarlos a su organismo⁵¹. Los hongos se clasifican en macro o microscópicos, dependiendo del tamaño de sus cuerpos fructíferos, donde se originan las esporas. Por lo tanto se considera un hongo microscópico a aquel que forma un cuerpo fructífero con tamaño menor de 1 milímetro⁵³. Los hongos más simples son las levaduras, que son unicelulares de forma redonda u oval, la mayoría de los hongos son multicelulares. Los hongos son organismos eucariotas, que se caracterizan por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas, constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen un micelio^{51,52}. El crecimiento del hongo ocurre en las puntas de las hifas, conforme las hifas se alargan, el hongo crece, formando una masa enmarañada o red llamada micelio; a los hongos que forman micelios se les llama mohos⁵¹.

México es un país con una amplia diversidad de organismos, ocupando el quinto lugar en el mundo gracias al gran número de especies y endemismos; cuenta con el 10% de la diversidad terrestre del planeta. En lo que se refiere a hongos, en México se estima que existen aproximadamente 200,000 especies, de las cuales solo se conoce el 3.2%, siendo los organismos del estado de Veracruz y Tabasco los más estudiados⁵⁴.

1.7.1 Potencial biotecnológico de los hongos

Los hongos son organismos productores de una gran cantidad y variedad de compuestos útiles para la industria, como proteínas, metabolitos secundarios, enzimas, péptidos, etc, que han sido una fuente importante para el desarrollo de la ciencia y la industria^{55,56}. Algunos de estos compuestos o moléculas son utilizados para la producción de medicamentos antifúngicos como la respofungina y la preusomerina⁵⁶, anticancerígenos como el taxol, inmunosupresores como la ciclosporina y medicamentos de control del colesterol como lovastatina^{57,58}. Además de ser precursores de pesticidas, fertilizantes, etc⁵⁹.

Los metabolitos secundarios sintetizados por los hongos han sido explotados por sus diversas actividades¹⁰. Esos productos naturales son de bajo peso molecular y son indispensables para la supervivencia del propio organismo⁵⁷. Entre los microorganismos con capacidad productora de metabolitos secundarios se destacan los hongos filamentosos gracias a su habilidad para producir una amplia variedad^{55,59}. Actualmente no se conoce el porcentaje de especies que han sido evaluadas de acuerdo a la producción de compuestos bio-activos⁵⁹. El uso de microorganismos y sus productos naturales para la preservación de los alimentos ha sido una práctica común⁶⁰, tal es el caso de la especie *Aspergillus candidus* que produce compuestos como la Dihidroximethyl piranona⁶¹. Los compuestos fenólicos son un grupo importante de metabolitos secundarios sintetizados por hongos; bajo condiciones de estrés, esos fenoles pueden proteger al cuerpo humano de los radicales libres⁶². En el caso de los hongos, se han reportado compuestos antioxidantes obtenidos de diferentes especies (Tabla1).

Tabla1. Informes recientes de especies de hongos con actividad antioxidantes

Especie	Inhibición de la oxidación	Control positivo	Método de detección	Referencia
<i>Pseudocercospora</i> sp.	N/E	Ácido ascórbico	DPPH, β Caroteno, poder reductor	Prihantini y Tachibana, (2017) ⁶³
<i>Acremonium charticola</i>	93 %	Ácido ascórbico	ABTS	Sugiharto <i>et al</i> , (2016) ²¹
<i>Aspergillus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	N/E	Ácido ascórbico	DPPH	Khiralla <i>et al</i> , (2015) ⁶⁴
<i>Grifola frondosa</i>	84 %	Trolox	Manchas de β Caroteno, poder reductor, quelador de iones	Smith <i>et al</i> , (2015) ⁶⁵
<i>Aspergillus</i> sp.	95 %	BHT	DPPH. Kit de aniones súper oxido, quelador de iones, Contenido de fenoles y flavonoides,	Cui <i>et al</i> , (2015) ⁶⁶
<i>Rizhopus oryzae</i>	N/E	Ácido ascórbico	DPPH	Schmidt <i>et al</i> , (2013) ⁶⁷
<i>Chaetomium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	80 %	Ácido ascórbico	DPPH, barrido de la prueba de peróxido de hidrogeno, prueba del poder de reducción	Yadav <i>et al</i> , (2014) ⁶⁸
<i>Cephalosporium</i> sp.	N.E	Ácido linoleico	Peroxidación de ácido linoleico	Sanchez-Fernandez <i>et al</i> , (2013) ⁵⁶
<i>Acremonium</i> sp.	N.E	Ácido ascórbico	DPPH, ABTS, contenido total de fenoles	Karmakar <i>et al</i> , (2013) ⁶⁹
<i>Aspergillus candidus</i>	95 %	Tocoferol	DPPH	Elaasser y Abdel (2011) ⁶¹
<i>Pycnopus sanguineus</i>	80 %	BHT	DPPH, β Caroteno/prueba ácido linoleico	Borderes <i>et al</i> , (2011) ⁷⁰
<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	N/E	Ácido ascórbico	DPPH, contenido total de Fenoles, actividad total de antioxidantes	Nitya <i>et al</i> . (2010) ⁷¹
<i>Phyllosticta</i> sp.	N/E	Tocoferol	ABTS, DPPH	Srinivasan <i>et al</i> , (2010) ⁷²
<i>Aspergillus</i> spp.	82 %	Ácido ascórbico	DPPH, poder de reducción, poder de reducción de hierro, quelante de metal y determinación de contenido total de fenoles.	DaljitSing y Priyanka (2010) ⁷³
<i>Aspergillus</i> sp. PR 38 <i>Aspergillus</i> sp. PR 15 <i>Aspergillus</i> sp. PR 22 <i>Aspergillus</i> sp. PR 38 <i>Penicillium</i> sp. PR 46	92 % 85 % 85 % 81 % 84 %	Ácido ascórbico	DPPH y poder de reducción, contenido total de fenoles	Chandra y Arora (2009) ²²

NE= No especificado.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La oxidación en los alimentos produce cambios a nivel fisicoquímico que afectan directamente las características nutricionales y organolépticas de los productos, desde cambios en su coloración, olor y textura que lo vuelven menos atractivo para su consumo. Los aditivos alimentarios son utilizados para mantener las características físicas de los alimentos, además de mejorar su apariencia y aumentar la vida de anaquel, algunos mejoran la calidad nutricional de los mismos. Entre los aditivos utilizados se encuentran conservadores, colorantes, edulcorantes, potenciadores de sabor, emulsificantes y antioxidantes. Estos últimos son importantes para mantener el sabor de los alimentos y evitar su deterioro, causa frecuente de la contaminación de los mismos, además de aumentar su calidad nutricional. Los antioxidantes utilizados en alimentos pueden ser de origen natural o sintético dependiendo de las características sensoriales del alimento. La industria alimentaria utiliza frecuentemente los antioxidantes sintéticos a pesar de que han surgido evidencias de que estos productos pueden ser carcinogénicos. De acuerdo con la OMS en 2012 las enfermedades cardiovasculares han provocado más de 17 millones de muertes, que representan el 31% de las todas las muertes registradas en el mundo⁷⁴; por lo que se considera como un problema de salud pública creciente. Sin embargo, se ha documentado que una dieta con consumo elevado de antioxidantes puede reducir el riesgo de tener enfermedades cardiovasculares, convirtiendo estos en un factor benéfico para la salud, además de ser un factor preventivo para cáncer. Con el fin reducir el consumo de los antioxidantes sintéticos que se utilizan ampliamente en la industria, es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales que puedan ser una alternativa para la utilización en alimentos y que no dañen al mismo tiempo los componentes de los alimentos. Estudios recientes indican que algunos hongos microscópicos son capaces de sintetizar compuestos orgánicos que podrían tener aplicaciones antioxidantes, proponiendo una alternativa viable para su aplicación en distintos tipos de alimentos.

Por todo lo anterior se hace la siguiente pregunta de investigación:

¿Los extractos de los hongos aislados en el estado de México presentan compuestos con actividad antioxidante tanto *in vitro* y en alimentos?

3. HIPÓTESIS

Hipótesis alterna:

Los extractos de los hongos aislados en el estado de México presentan compuestos con actividad antioxidante tanto *in vitro* como en alimentos.

Hipótesis nula:

Los extractos de los hongos aislados en el estado de México no presentan compuestos con actividad antioxidante ni *in vitro* ni en alimentos.

4. OBJETIVOS

Generales:

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de hongos aislados del Estado de México *in vitro* y en alimentos.

Específicos:

- Reactivar las cepas de hongos microscópicos originarios de los humedales de Lerma, la Sierra de Nanchititla y Valle de Bravo del Estado de México.
- Conservar las cepas aisladas mediante crio-preservación.
- Obtener los extractos crudos de los hongos y evaluar su capacidad antioxidante mediante la prueba de auto-oxidación del pirogalo.
- Seleccionar los extractos crudos activos y fraccionarlos en 3 diferentes polaridades (hexano, acetona y metanol).
- Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones en carne de pollo mediante la prueba de TBARS.
- Determinar la citotoxicidad de las fracciones con actividad antioxidante en fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™).
- Identificar taxonómicamente las cepas fúngicas que presentaron evidencia de actividad antioxidante, mediante las guías Watanabe, Barnett y Hunter.

5. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento de la población a nivel mundial, se espera que aumente el consumo de alimentos y por consiguiente la utilización de aditivos que prolonguen tanto su vida útil, como conservar sus características organolépticas. Por lo que se prevé que el mercado mundial de los antioxidantes aumente durante los próximos años. Actualmente se ha informado que, de los antioxidantes utilizados por la industria, algunos pueden llegar a ser perjudiciales para la salud, inclusive, el consumo elevado puede ser interpretado como posible factor de riesgo en el desarrollo de algunas enfermedades como diferentes tipos de cáncer. Por ello es necesario encontrar nuevas fuentes de antioxidantes que resulten inocuas, accesibles y aplicables a una extensa variedad de alimentos; además de certificar que estos compuestos incrementen el valor nutritivo de dichos productos. Se encuentra evidencia de que diversas especies de hongos microscópicos producen una variedad de sustancias químicas, entre ellas con capacidad antioxidante. Dichas sustancias podrían ser candidatas para su utilización en la industria alimentaria, aumentando la vida de anaquel y disminuyendo los desperdicios y mermas del producto. Además, mantener la inocuidad y mayor seguridad de dichos productos disminuiría la incidencia de intoxicaciones con alimentos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS:

6.1 Diseño de Estudio

Tipo de estudio

Experimental.

Universo

Hongos microscópicos aislados en el Estado de México.

Población

Hongos microscópicos aislados de algunos humedales de Lerma, la sierra de Nanchititla y los bosques de Valle de Bravo del Estado de México.

Muestra

Cepas de hongos microscópicos aislados del Estado de México.

Método de muestreo

No probabilístico por conveniencia.

Tamaño de muestra

99 cepas de hongos microscópicos.

6.2 Criterios de inclusión y eliminación

Criterios inclusión

Hongos con crecimiento formado por micelio aislados en el Estado de México.

Criterios eliminación

Aislamientos de microorganismos que no presenten características de hongos filamentosos, así como actinomicetos con pseudo-micelio.

6.3 Procedimientos



1.-Reactivacion de cepas



2.-Purificación



3.-Crio-preservación



4.- Obtencion de extractos crudos para la prueba preliminar de actividad antioxidante

(Auto-oxidacion del pirogalol)



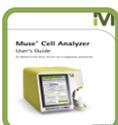
5.-Estratos crudos activos.

Fraccionamiento de los extractos en los disolventes hexano, acetona y metanol (Columna Sep Pak® CartrigeC18)



6.-Evaluacion de las fracciones en carne de pollo

(Prueba antioxidante TBARS)



7.-Prueba citotoxicidad

Celulas de fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)



8.-Identificacion taxonomica tradicional

(Guías Watanabe, Barnett y Hunter)

6.3.1 Reactivación de cepas

Se reactivaron cepas aisladas de la sierra de Nanchititla, Valle de Bravo y los humedales de Lerma. Las cepas fueron inoculadas en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) Bioxon® se incubaron 26° C durante 14 días.

6.3.2 Purificación de cepas fúngicas

Una vez que se confirmó el crecimiento, se verificó que fueran cultivos con una morfología uniforme, sin la presencia de contaminación por otras cepas fúngicas o que presentaran la presencia de crecimiento bacteriano.

6.3.3 Conservación de cepas fúngicas

Ya confirmado el crecimiento de la cepa sin contaminación, fueron conservadas por dos métodos:

- a) Tubo inclinado: Se adicionó 1mL de PDA en tubos Eppendorf®, se esterilizaron y antes de que gelificaran los tubos, fueron inclinados. Cada cepa, previamente desarrollada, se inoculó en el tubo por duplicado a una temperatura 25°C durante 7 días, posteriormente se almacenaron en refrigeración (4°C).
- b) Crio-preservación: Cada cepa fúngica fue inoculada en una caja de Petri con medio PDA estéril, se incubándose durante siete días a 25°C, posteriormente con un sacabocado estéril se tomaron 5 discos de 5mm de diámetro y se depositaron en un 1.4mL de una solución de agua destilada con glicerol (80:20%) y se conservaron a -71°C.

6.3.4 Prueba preliminar de la actividad antioxidante mediante la oxidación del Pirogalol

Se realizó una prueba preliminar de la actividad antioxidante mediante el método de “superoxido dismutasa” propuesto por Marklund, 1974⁴⁶ que se basa en la oxidación del Pirogalol. Cada cepa fúngica se inoculó en Caldo Papa Dextrosa (PDB) Bioxon®, fue incubado a 26° C durante 14 días, posteriormente. Se utilizó la metodología de Zhang 2016⁷⁵, con ligeras modificaciones. La mezcla de la reacción se realizó en un buffer de trizima al 0.2M con pH 8.2 y se agregó 1 mg de pirogalol por cada mL de buffer.

A los extractos fúngicos en crudo se les midió la absorbancia (420nm) y posteriormente se les agregó la mezcla de pirogalol con buffer y se midió la absorbancia durante media hora. Los extractos secos fueron re-suspendidos en metanol en proporción 1mg/1mL; se les midió la absorbancia inicial, posteriormente se agregó la mezcla de pirogalol con buffer y se agregó en proporción 1:1 con el extracto re-suspendido, al cual se le midió la absorbancia cada 5 minutos durante media hora⁷⁶.

6.3.5 Obtención de extractos fúngicos en acetato de etilo (AcOEt)

Las cepas fúngicas que dieron evidencia de la actividad antioxidante preliminar se inocularon en 1000mL de PDB, se incubaron a 25°C durante 14 días; posteriormente el cultivo fue filtrado a través de papel filtro Watman® #5 previamente esterilizado. Al extracto crudo se le agregó AcOEt (C₄H₈O₂), en una proporción de 1:1. Se agitó durante 1 minuto separando las fases: la fracción acuosa, y la fracción de acetato de etilo. El acetato de etilo se eliminó mediante roto-evaporación a presión reducida (450pa) a 40°C, en un roto-evaporador Ika®⁶⁹, la fase acuosa fue desechada y el extracto seco fue pesado (mg).

6.3.6 Fraccionamiento en columnas

Los extractos orgánicos obtenidos mediante AcOEt fueron fraccionados utilizando una columna Sep-Pak cartridge® C18 de 6CC, la columna se acondicionó con 2 mL de metanos seguido por 2 mL de Acetato de etilo. El extracto fúngico, previamente pesado, fue re suspendido en acetato de etilo a una concentración de 20mg/mL, posteriormente se adicionó a la columna seguido por los disolventes: hexano (10mL), acetona (15mL) y metanol (10mL), el disolvente se evaporó a temperatura ambiente, obteniendo 3 fracciones (mg) de diferente polaridad.

6.3.7 Ensayo antioxidante en carne de pollo (TBARS)

Preparación de la muestra: Las fracciones de los extractos de los hongos que presentaron actividad antioxidante *in vitro*, fueron agregadas a la carne de pollo, en una concentración de 1mg de extracto disuelto en DMSO en 1 mg de carne, posteriormente se colocaron en bolsas con entrada y salida de oxígeno y fueron almacenadas en refrigeración a 4°C durante 3 días. Al tercer día de refrigeración a las muestras de pollo tratado, se trasladaron a tubos Eppendorff de 2mL y se les agregó 500µL de PBS frío y se homogenizó la muestra durante 100 segundos (5 ciclos de 20 segundos) y se dejó enfriar cada muestra en una cama de hielo.

Posteriormente se tomó una alícuota de 100µL del sobrenadante de cada una de las muestras a las que se les agregaron 200µL de ácido tricloroacético y se mantuvo en refrigeración (4°C) durante 5 min. Posteriormente se centrifugo a 14000 rpm durante 5 minutos y posteriormente se dejó enfriar en una cama de hielo y se trasladó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 200µL de ácido tiobarbitúrico y fue mezclado con ayuda de un vortex durante 5s por cada muestra. Después de ser mezclado con vortex, se incubaron los tubos en un baño maría a 100°C durante una hora. Finalmente se trasladó el resultado en una placa de 96 pozos, para posteriormente ser leída a 535nm en un espectrofotómetro para microplacas epoch biotek®.

6.4 Prueba de Citotoxicidad en fibroblastos

Se determinó la citotoxicidad de las fracciones que presentaron mayor actividad antioxidante en la prueba TBARS.

6.4.1 Preparación del medio de cultivo

Los fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) se mantuvieron en medio DMEM, suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), bicarbonato de sodio 3.7g/L, glutamina 2mM y antibiótico al 10%, incubados a 37°C con 80% de humedad y 5% CO₂. Para preparar 500mL del medio, se pesaron los elementos sólidos en la balanza (medio DMEM y bicarbonato de sodio) y se disolvieron en 300mL de agua tipo 1. Se ajustó el pH a 7.4 (± 0.2) y se aforó a 500mL. Se quitaron 50mL de la solución y se agregaron los suplementos líquidos (glutamina, suero bovino fetal, antibiótico), se mezcló y aforó a 500mL con el medio que se había retirado. Dentro de una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad se filtró la solución con una unidad de filtración utilizando una bomba de vacío y se depositó en recipientes estériles. Se rotuló con el nombre del medio, la fecha y el nombre de quien lo preparó.

6.4.2 Obtención de suspensión celular

Una vez que el cultivo celular alcanzó la confluencia se lavó con PBS estéril y se trató con una solución de tripsina/EDTA (0.25/0.03%) para despegar las células de la caja. Las células suspendidas se recuperaron y se lavaron con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Para determinar el número y viabilidad celular se hizo el recuento de células en la cámara de Neubauer, para lo cual se tomó un tubo microtubo de 600uL, al cual se le añaden 10 µl de la suspensión celular y 10µl de azul de tripano. El azul de

tripano es un colorante vital que tiñe selectivamente a las células dañadas o muertas y de este modo, permite distinguir a las células muertas (azules) de las vivas (no teñidas). Para calcular el número total de células viables en la suspensión, se cuentan las células en los 4 cuadrantes y se obtiene el promedio de las células en los 4 cuadrantes, se multiplica por el factor de dilución (2) y por 10,000 y así se obtiene la cantidad de células en un mililitro.

6.4.3 Prueba de viabilidad de fracciones de extractos de hongos

Para realizar la prueba de citotoxicidad se siguieron las instrucciones del fabricante (Muse Count Viability kit[®]) Las células fueron divididas en alícuotas de 8,000 células disueltas en 190 μ L de medio RPMI suplementado con suero bovino fetal, antibiótico y bicarbonato en las concentraciones descritas anteriormente, adicionalmente se agregó 10 μ L de la fracción del extracto fúngico disuelto DMSO (200 mg/mL), se incubó durante 24h a 37°C con 80% de humedad y 5% CO₂. Posteriormente se tomaron 10 μ L de la suspensión celular con la fracción de extracto, a la que se le adicionó 90 μ L de reactivo Count Viability kit[®] y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente para después correr la prueba en el citómetro Muse Analyser[®], definiendo para esta prueba el factor de dilución 10 y teniendo 300 eventos como mínimo.

6.5 Identificación de especies fúngicas activas

Se realizó la técnica de micro-cultivo de hongo⁷⁷, en donde se agregó una mezcla de agua y glicerol (5%), en una caja Petri con un portaobjetos sobre 2 varillas de vidrio, todo previamente esterilizados. Sobre el portaobjetos se colocó un cuadro de agar papa dextrosa y fue inoculado con la cepa activa, se dejó incubar a 26°C durante 7 días. Posteriormente se descartó el agua con glicerol, se agregó formaldehído al 10% y se dejó a temperatura ambiente por dos horas. Posteriormente se retiró el cuadro de agar y al portaobjetos con la muestra se agregó una gota de azul de algodón y se observó al microscopio. Las cepas fúngicas activas fueron identificadas taxonómicamente mediante las guías de Watanabe⁷⁸ y Barnett y Hunter⁷⁹.

6.6 Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de ANOVA para comparar los valores de las medias de las muestras y los controles.

6.7 Variables de Estudio

Independientes:

Hongos microscópicos aislados en el estado de México

Dependientes:

Actividad antioxidante

Intervinientes:

- Temperatura
- Humedad

Cuadro 1. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Hongos microscópicos	Dicho de un organismo microscópico: Que tiene aspecto de moho, nutrición heterótrofa y reproducción por esporas, y abunda en la hojarasca de bosque y otros sustratos orgánicos.	Identificación de hongos con crecimiento de micelio y estructuras reproductivas menores a 1 mm	Cualitativa nominal	Género	N/A
Actividad antioxidante	Compuesto químico, natural o sintético, que inhibe o retrasa el proceso de oxidación.	extracto con actividad antioxidante	Cuantitativa	% inhibición	Análisis de varianza
Actividad antioxidante en alimentos	Compuesto químico, natural o sintético, que inhibe o retrasa el proceso de oxidación en alimentos	Actividad antioxidante de las fracciones en la prueba de TBARS	Cuantitativas	% inhibición	Análisis de Varianza
Viabilidad en fibroblastos	Células que por sus circunstancias tiene posibilidad de vivir.	% de fibroblastos de ratón vivos	cuantitativa	(% de células vivas)	t-student

6.8 Implicaciones Bioéticas

La realización de este proyecto respetó las siguientes Normas, Convenios y Protocolos: Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades; determina las especificaciones mínimas que deben tener los medios de cultivo para microorganismos en general⁸⁰.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud Ambiental – Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

Numeral 4. Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Numeral 6. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos⁸¹.

Convenio sobre la diversidad biológica de las Naciones Unidas, suscrito en Río de Janeiro en junio de 1992⁸². Decisión del Consejo 93/626/CEE.

El Convenio tiene tres objetivos:

- a) La conservación de la diversidad biológica.
- b) El uso sostenible de componentes de la diversidad biológica.
- c) El reparto justo y equitativo de los beneficios derivados de la utilización de recursos genéticos.

El Convenio establece que sus firmantes deberán evitar o minimizar el impacto negativo resultante del uso de los recursos biológicos.

Protocolo de Cartagena Sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la diversidad biológica. (2002/628/CE)⁸³.

Artículo 2. Disposiciones generales: Las Partes velarán por que el desarrollo, la manipulación, el transporte, la utilización, la transferencia y la liberación de cualesquiera organismos vivos modificados se realicen de forma que se eviten o se reduzcan los riesgos para la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana.

7. RESULTADOS

7.1 Artículo:

Actividad antioxidante de extractos orgánicos de hongos filamentosos. Ensayo en carne de pollo

7.1.1 Página frontal del manuscrito

Actividad antioxidante de extractos orgánicos de hongos filamentosos. Ensayo en carne de pollo

Antioxidant activity of organic extracts of filamentous fungi. Chicken meat assay

Ayala-Cortés S¹, Erika Azorín-Vega², Isaac-Olive K¹, Martínez-Carrillo BE¹, Ramírez-Durán N¹, Martínez-Vázquez M³, Moreno-Pérez P. A^{1*}.

¹ Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México

² Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

³ Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

*Autor de correspondencia

Martín Pablo Antonio Moreno Pérez.

Av Paseo Tollocan, Calle Jesús Carranza, Moderna de la Cruz, 50180 Toluca de Lerdo, Méx. 722 647 5036. Saieto@hotmail.com

Resumen

Los antioxidantes dietéticos son sustancias que forma parte o que se adiciona a los alimentos para protegerlos de los efectos de los radicales libres, pero el consumo de antioxidantes sintéticos rebasa los límites máximos recomendados, pudiendo ocasionar daños a la salud. Los hongos filamentosos producen diversos compuestos con potencial biotecnológico, como el compuesto antioxidante Dihroximetil piranona producida por la especie *Aspergillus candidus*. **Objetivo** fue valorar la actividad antioxidante de extractos orgánicos de hongos filamentosos *in vitro* y en carne de pollo. **Métodos:** Se reactivaron cepas de hongos filamentosos y se obtuvo su extracto crudo en medio PDB, se avaluó su capacidad antioxidante mediante la técnica de oxidación del pirogalol. Se fraccionaron los extractos en columnas Sep-Pack cartridge[®] con hexano, acetona y metanol, las fracciones se evaluaron en carne de pollo por medio de la técnica TBARS. Se determinó la citotoxicidad en fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC[®] CRL-1658[™]). Las cepas activas fueron identificadas taxonómicamente mediante las guías de Watanabe, Barnett y Hunter.

7.1.2 Carta de envío o aceptación

Actividad antioxidante de extractos orgánicos de hongos ▶ Recibidos x ⌵ 🖨 🔗

 **chava Ayala Cortés** 📧 Lun., 14 oct. 12:50 (hace 2 días) ☆

Le envió un cordial saludo al equipo de editores de la revista. El motivo de este mail es la posible publicación de los resultados de nuestro proyecto en su rev

 **Rev Mex Cienc Farm** 14:44 (hace 10 minutos) ☆ ↶ ⋮

para mí ▾

Estimado Ayala Cortés:

Confirmando de recibida su propuesta. En breve le estaré haciendo llegar la respuesta del Comité Editorial acerca de la factibilidad de ser sometido a evaluación.

Saludos cordiales

p.Q.F.B. Amaranta Robles Ortega
Asistente del Editor
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas
Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.
Nicolás San Juan 1511
Del Valle, C. P. 03100
Benito Juárez, Ciudad de México, México
+52 (55) 9183 2065
rmcf@afmac.org.mx

☰

De: chava Ayala Cortés [mailto:chavayala2806@gmail.com]
Enviado el: lunes, 14 de octubre de 2019 12:51 p. m.
Para: rmcf@afmac.org.mx

7.1.3 Resumen

Los antioxidantes dietéticos son sustancias que forma parte o que se adiciona a los alimentos para protegerlos de los efectos de los radicales libres, pero el consumo de antioxidantes sintéticos rebasa los límites máximos recomendados, pudiendo ocasionar daños a la salud. Los hongos filamentosos producen diversos compuestos con potencial biotecnológico, como el compuesto antioxidante Dihidroximetil piranona producida por la especie *Aspergillus candidus*. El objetivo fue valorar la actividad antioxidante de extractos orgánicos de hongos filamentosos *in vitro* y en carne de pollo.

Métodos: Se reactivaron cepas de hongos filamentosos y se obtuvo su extracto crudo en medio PDB, se avaluó su capacidad antioxidante mediante la técnica de oxidación del pirogalol. Se fraccionaron los extractos en columnas Sep-Pack cartridge® con hexano, acetona y metanol, las fracciones se evaluaron en carne de pollo por medio de la técnica TBARS. Se determinó la citotoxicidad en fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™). Las cepas activas fueron identificadas taxonómicamente mediante las guías de Watanabe, Barnett y Hunter. **Resultados:** Se reactivaron 99 cepas fúngicas y se obtuvo su extracto, 25 extractos de Acetato de etilo presentaron actividad antioxidante (> 6%), 14 fueron los más activos con un porcentaje de inhibición de la oxidación >30%. Se obtuvieron 39 fracciones que se evaluaron en carne de pollo (TBARS), 28 presentaron inhibición de la oxidación > 32%; las fracciones de hexano (cepas 57, 58, 127), acetona (cepas 10, 58, 118, 304) y metanol (cepas 14, 58, 304) >40%. Solo las fracciones de hexano (cepas 58 y 127) no presentaron citotoxicidad (>92% de viabilidad celular/200 mg/mL). Las cepas fúngicas que presentaron actividad antioxidante pertenecen a los géneros *Fusarium* (10), *Penicillium* (118), *Eudarluka* (127) y *Aspergillus* (304), las cepas 14, 57, 58 pertenecen a cepas fúngicas con micelio estéril. **Conclusión.** Los extractos y fracciones de diferente polaridad obtenidos de hongos filamentosos aislados del Estado de México presentan actividad antioxidante al inhibir la oxidación *in vitro* y en carne de pollo.

Palabras clave: fungí, oxidación, conservador de alimentos, aditivo alimentario.

7.1.4 Abstract

Dietary antioxidants are substances that are part of the food addition to protect them from the effects of free radicals, but the consumption of synthetic antioxidants exceeds the recommended maximum limits, which can cause damage to health. Filamentous fungi produce various compounds with biotechnological potential, such as the antioxidant compound Dihydroxymethyl pyranone produced by the *Aspergillus candidus* species. The **objective** was to evaluate the antioxidant activity of organic extracts of filamentous fungi in vitro and in chicken meat. **Methods:** Strains of filamentous fungi were reactivated and their crude extract was obtained in PDB medium, their antioxidant capacity was evaluated by means of the pyrogallol oxidation technique. The extracts are divided into Sep-Pack cartridge® columns with hexane, acetone and methanol, the fractions were evaluated in chicken meat by means of the TBARS technique. Cytotoxicity was determined in mouse fibroblasts (NIH / 3T3 (ATCC® CRL-1658™)). The active strains were taxonomically identified by the Watanabe, Barnett and Hunter guidelines. **Results:** 99 fungal strains were reactivated and their extract was obtained, 25 extracts presented antioxidant activity (> 6%), 14 were the most active with a percentage of oxidation inhibition >30%, of which the latter obtained 39 fractions, of which 28 fractions showed oxidation inhibition (>32%). The fractions that exhibited a >40% oxidation inhibition (TBARS) in chicken meat were: the hexane fractions of strains 57, 58 and 127, of acetone 10, 58, 118, and 304, of methanol 14, 58 and 304. Only the hexanic fractions of strains 58 and 127 did not show cytotoxicity, having a cell viability >92% (200 mg / mL). The fungal strains that presented antioxidant activity belong to the genera *Fusarium* (10), *Penicillium* (118), *Eudarluka* (127) and *Aspergillus* (304), strains 14, 57, 58 belong to fungal strains with sterile mycelium **Conclusion** Extracts and fractions of different polarity of asylated filamentous fungi of the State of Mexico have antioxidant activity by inhibiting oxidation in vitro and in chicken meat.

7.1.5 Introducción

Los aditivos alimentarios son ingredientes agregados a los productos procesados y en producción para incrementar el valor nutritivo, la preservación y mejorar las propiedades sensoriales¹. Entre estos se encuentran los antioxidantes, que en la industria alimentaria son indispensables ya que tienen la capacidad de reaccionar con radicales libres, reduciendo su reactividad y manteniendo el color, olor y apariencia del producto para el consumidor^{2,3}. La oxidación provoca afectaciones en todo tipo de biomoléculas presentes en los alimentos como hidratos de carbono, nucleótidos, proteínas y lípidos, generando más radicales libres, que a su vez oxidan mayor cantidad de moléculas⁴. Los alimentos con mayor cantidad de ácidos grasos insaturados, son los más afectados por este fenómeno de auto oxidación gracias a la disponibilidad de reacción entre los radicales libres y los dobles enlaces^{4,5}, esto provoca cambios organolépticos, modificando la textura y provocando un mal sabor⁶. Los antioxidantes transfieren electrones que reaccionan con los radicales libres así como con otras especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta forma disminuyen o retardan el proceso de oxidación^{3,7}. De acuerdo con los estándares de la Unión Europea y los Estándares Nacionales de Alimentos de los Estados Unidos NFS por sus siglas en inglés (National Food Standards)⁸⁻¹⁰, el consumo de antioxidantes sintéticos rebasa los límites máximos recomendados; además se ha reportado que los antioxidantes sintéticos BHA y BHT ampliamente utilizados en la industria se eliminan rápidamente, aunque puede permanecer en los tejidos a largo plazo provocando toxicidad pulmonar y con ello desarrollo de células pulmonares en ratones^{11,12}.

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotas, que se caracterizan por la formación de estructuras filamentosas, constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen un micelio^{13,14}. Se estima que en México existen aproximadamente 200,000 especies de hongos de las cuales solo se conoce el 3.2 %¹⁵. Los hongos filamentosos producen una gran cantidad y variedad de compuestos útiles para la industria, como antibióticos, enzimas, fertilizantes, fungicidas, pesticidas, péptidos y metabolitos secundarios y que han sido una fuente importante para el desarrollo de la ciencia y la industria^{16,17}. Recientemente se ha encontrado evidencia de actividad antioxidante del compuesto dihydroxymethyl pyranone obtenido de la especie *Aspergillus candidus*; ácido gálico de *Rizhopus oryzae*¹⁸ y grafislactona producida por *Cephalosporium* sp.¹⁷ que inhibe la oxidación del ácido linoleico. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante de los extractos

orgánicos de hongos filamentosos *in vitro* y su potencial viabilidad en la conservación de alimentos.

7.1.6 Materiales y métodos:

Se aislaron hongos filamentosos a partir de muestras de hojarasca y suelo en 4 regiones del estado de México: 1. la Sierra de Nanchititla: latitud 18°47'42" N y longitud 100°15'58" O, a latitud 18°58'03" N y longitud 100°35'35"O, 2000 msnm); 2. Islas vegetales de la Ciénega de Lerma: latitud 19° 06' 29"N y longitud 99° 30' 53"O a latitud 19° 21' 48"N y longitud 99° 30' 13" O, 2850 msnm). 3. El bosque de valle de bravo (Latitud: 19°11'42" N, Longitud: 100°07'52" O, 2850 msnm 1826); 4 la sierra de San Miguel Tecomatlán: latitud 18.97° 83' 33" N longitud 99.52° 86' 11" O, 2350 msnm).

Las muestras de suelo y material vegetal fueron colocadas sobre un papel humedecido con agua destilada estéril dentro de un recipiente de plástico con tapa (cámaras húmedas), se mantuvieron a temperatura ambiente y entorno de oscuridad y humedad durante 14 días. Los micelios crecidos sobre el material vegetal fueron transferidos con un asa micológica en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA) (Bioxon®) complementados con Amikacina (0.25 mg/mL), se incubaron 26°C en oscuridad durante 14 días.

Una vez que las cepas de hongos filamentosos tuvieron morfologías unificadas, fueron conservadas en criotubos (Coring®). Los criotubos fueron previamente esterilizados con 1mL de agar PDA, y gelificados inclinadamente. En la superficie del agar dentro del criotubo se inoculo la cepa de hongo filamentosos. Los criotubos inoculados fueron incubados a 26°C por 7 días y posteriormente se transfirieron a refrigeración a 4°C.

Simultáneamente, se transfirieron las cepas de hongos filamentosos a matraces de 150mL conteniendo 50mL de medio PDA, la cantidad inoculada fue una asada de cada cepa por matraz. Los Matraces inoculados fueron incubados a 26° durante 14 días en oscuridad. Posteriormente se tomaron alícuotas de 5mL de biomasa de cada matraz, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a tubos cónicos de 15 mL estériles.

Prueba preliminar de la actividad antioxidante

Se realizó por la técnica de detección de oxidación del pirogalol¹⁹. Se preparó un buffer de trizima (sigma®) 0.2M, pH 8.2. Se adicionó 1mg/mL pirogalol (Merck®). De los 99 sobrenadantes obtenidos, a 68 se les agrego acetato de etilo (1:1 x 3), se mezclaron por 10 minutos en un embudo de separación para obtener 2 fases. La fracción acuosa

fue desechada y el disolvente se eliminó en un roto evaporador ika[®] RV3 a 40°C. El producto obtenido de la rotoevaporación fue resuspendido con metanol (19 extractos) y con DMSO (20 extractos) a una concentración de 1mg/mL. Se transfirió 1.5mL de la solución del buffer de trizima con pirogalol y se agregó 1.5mL del sobrenadante o extracto obtenido del sobrenadante. Se midió la absorbancia a 520nm al inicio de la reacción y cada 5 min durante 30 min en un espectrofotómetro (GLOBE[®]) Modelo CS-2000 PC con celdas de 1 mm de grosor y 3 mL de capacidad. Se determinó la actividad antioxidante utilizando la fórmula: $\% \text{ oxidación} = \frac{Abs_f - Abs_i}{Abs C} \times 100$, donde la Abs_f , es la absorbancia del extracto con el buffer de trizima y pirogalol después de 30 min, Abs_i es la absorbancia inicial del extracto con el buffer de trizima y pirogalol, $Abs C$ es la diferencia de la absorbancia inicial y final del buffer de trizima y pirogalol con el control. Los controles utilizados fueron Metanol, DMSO, y medio Papa Dextrosa.

Obtención y fraccionamiento de los extractos

Las cepas productoras de extractos que dieron evidencia de actividad antioxidante en la prueba preliminar, fueron inoculadas en 1000mL de medio PDB estéril, e incubadas durante 14 días a 26°C en oscuridad. El micelio fue separado del medio a través de filtración por succión con matraz Büchner conectado a una bomba de vacío. El micelio fue recolectado en papel filtro (Watman[®]) #5. El medio resultante se mezcló con acetato de etilo (1:1 x 3) para obtener dos fracciones. La fracción acuosa fue descartada y el disolvente se eliminó en un roto evaporador (ika[®]) RV3 a 40°C y a presión reducida. El extracto seco obtenido de la rotoevaporación fue re-suspendido en acetato de etilo (20mg/mL), fue vertido en una columna (Sep Pack Cartridge[®]) C18 6cc, previamente acondicionada con 2mL de metanol seguido por 2mL de acetato de etilo. Al extracto dentro de la columna se adicionaron 10mL de hexano, 15mL de acetona y 10mL de metanol hasta obtener 3 fracciones de diferente polaridad, fracción "H" (Hexano), fracción "A" (Acetona) y fracción "M" (Metanol) el disolvente se evaporó a temperatura ambiente.

Medición de la actividad antioxidante en carne de pollo con el ensayo de ácido tiobarbitúrico TBARS.

Las tres fracciones de los extractos: hexano, acetona y metanol se re-suspendieron en DMSO (200ul/mL). Posteriormente se adicionaron a la carne cruda molida de pollo comercial, [1mg de extracto/1 mg de carne], las muestras se colocaron en bolsas que

permitían la aireación y fueron almacenadas en refrigeración a 4°C durante 3 días. Después del almacenamiento la carne de pollo tratada se colocó en tubos eppendorff de 2mL y se les agregó 500µL de buffer de fosfato salino (PBS) frío, se homogeneizó cada una de las muestras durante 5 ciclos de 20 segundos con un homogeneizador WT-130 serie2. La carne se precipitó y se tomó una alícuota de 100µL del sobrenadante de cada una de las muestras. A las alícuotas de sobrenadante se les adicionaron 200µL de ácido tricloroacético, se mantuvieron en refrigeración (4°C) durante 5 min. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos, se agregaron 200µL de ácido tiobarbitúrico, se mezcló por inmersión. Los tubos con la mezcla se incubaron en baño maría a 100°C durante una hora. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pozos, que fue leída a 535nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch biotek®)

Citotoxicidad en fibroblastos

Se utilizaron fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), mismos que se mantuvieron en medio dulbecco modified Eagles minimal essential medium (DMEM), complementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), bicarbonato de sodio 3.7g/L, glutamina 2mM y amikacina al 10%, incubados a 37°C con 80% de humedad y 5% CO₂. Para preparar 500mL del medio, se pesaron los elementos sólidos en la balanza (medio DMEM y bicarbonato de sodio) y se disolvieron en 300mL de agua tipo 1. Se ajustó el pH a 7.4 (± 0.2) y se aforó a 500mL. Se quitaron 50mL de la solución y se agregaron los suplementos líquidos (glutamina, suero bovino fetal, antibiótico), se mezcló y aforó a 500mL con el medio que se había retirado. Dentro de una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad se filtró la solución con una unidad de filtración utilizando una bomba de vacío y se depositó en recipientes estériles.

Obtención de suspensión celular

Una vez que el cultivo celular alcanzó la confluencia se lavó con PBS estéril y se trató con una solución de tripsina/EDTA (0.25/0.03%). Las células suspendidas se recuperaron y se lavaron con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Para determinar el número y viabilidad celular se hizo el recuento de células en la cámara de Neubauer, para lo cual se tomó un tubo microtubo de 600µL, al cual se le añaden 10 µl de la suspensión celular y 10µl de azul de tripano.

Prueba de viabilidad de fracciones de extractos orgánicos de hongos filamentosos.

Las células fueron divididas en alícuotas de con medio RPMI complementado con suero bovino fetal, antibiótico y bicarbonato en las concentraciones descritas anteriormente, además se les agregaron 10µL de la fracción del extracto de hongo filamentoso disuelto DMSO en una concentración de 200 mg/mL y se dejó incubar durante 24h a 37°C con 80% de humedad y 5% CO₂. Posteriormente se tomaron 10µL de la suspensión celular con la fracción de extracto, a la que se le adicionó 90µL de reactivo (Count Viability kit®) y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente para después correr la prueba en el citómetro (Muse Analyser®) definiendo para esta prueba el factor de dilución 10 y teniendo 300 eventos como mínimo.

Identificación morfológica

Se identificaron las características taxonómicas macroscópicas, como el tipo de micelio, aspecto, color y textura de la colonia, y microscópicas como la identificación de la morfología de las hifas, células conidiógenas y esporas. Para identificar las características microscópicas: se tomó una muestra del micelio aéreo procurando no maltratar el estado de las hifas y de las células conidiogenas con un asa micológica y se colocó en porta objeto, se agregó una gota de azul de algodón, se cubrió con cubre objetos. La preparación se observó al microscopio identificando las estructuras fúngicas taxonómicamente mediante las guías de Watanabe (2002) y Barnett y Hunter (1998)^{20,21}.

7.1.7. Resultados y discusión

Aislamiento de hongos filamentosos y obtención de extracto

Se aislaron 99 cepas de hongos filamentosos con características morfológicas diversas en 4 regiones del Estado de México (Figura 1). Los sobrenadantes de hongos filamentosos fueron distribuidos en 3 grupos para la obtención del extracto y la prueba preliminar con pirogalol: Grupo 1. Se re-suspendieron 34 extractos con DMSO y se evaluó la actividad antioxidante, manteniendo el DMSO como control negativo. Grupo 2. Se re-suspendieron 34 extractos con metanol y se evaluó la actividad antioxidante con respecto al control negativo (metanol). Grupo 3. Se evaluó la actividad antioxidante de 42 sobrenadantes, manteniendo el medio papa dextrosa como control negativo.

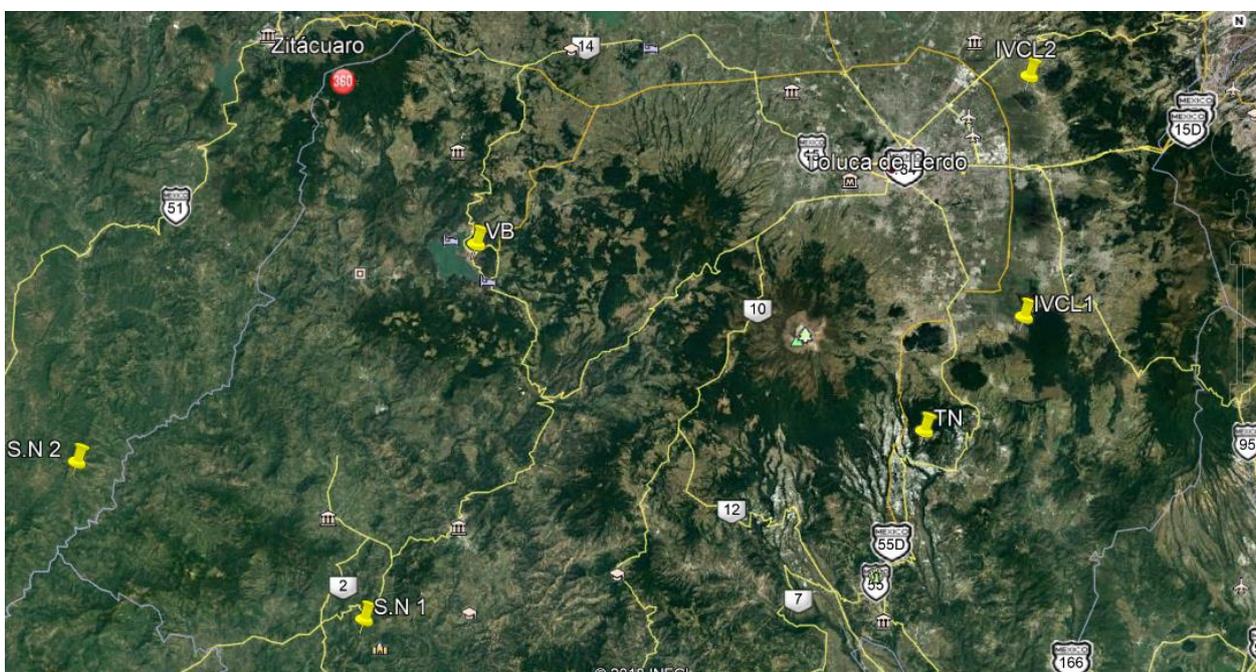


Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo de los hongos filamentosos: SN1-SN2, La Sierra de Nanchititla. IVCL1-IVCL2, Islas vegetales de la Ciénega de Lerma. VB, El bosque de Valle de Bravo. TN, Sierra de San Miguel Tecomatlán.

Prueba preliminar de la actividad antioxidante

Se encontraron diferencias estadísticas en los porcentajes de inhibición de la oxidación del pirogalol (*t*-Student $p < 0.05$, respecto al control), donde se obtuvieron valores hasta el 96% de inhibición con respecto al control (figura 2). Los 14 extractos de las cepas: 2, 14, 22, 57, 58, 59, 75, 89, 95, 112, 118, 126, 127, 304 se les atribuye actividad antioxidante. Los extractos y sobrenadantes contuvieron la oxidación del pirogalol hasta en un 97% (extracto disuelto en metanol de la cepa 14), cifras superiores a las obtenidas por otros autores, por ejemplo, Sharma *et al.* (2018)²², 80% (fracción de acetato de etilo) de *Aspergillus* sp. que utilizó el reactivo DPPH; Daljit *et al.* (2010)²³ reportaron actividad antioxidante de 82% de extractos provenientes de *Aspergillus*, sin embargo utilizó caldo Czapek dox, y lo mantuvo en incubación por 10 días a 25°C a diferencia de las condiciones en las que fueron cultivados los hongos (14 días en condiciones de oscuridad y sin agitación). Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante dependen directamente de las condiciones de la obtención del extracto²⁴ por ejemplo: incubación, temperatura, PH, condiciones de luz y sustrato; además de los solventes utilizados para la obtención del extracto, entre ellos destaca el acetato de etilo del cual se obtiene el mejor rendimiento para la extracción de fenoles de bajo y alto peso molecular, seguido por el cloroformo y butanol²³.

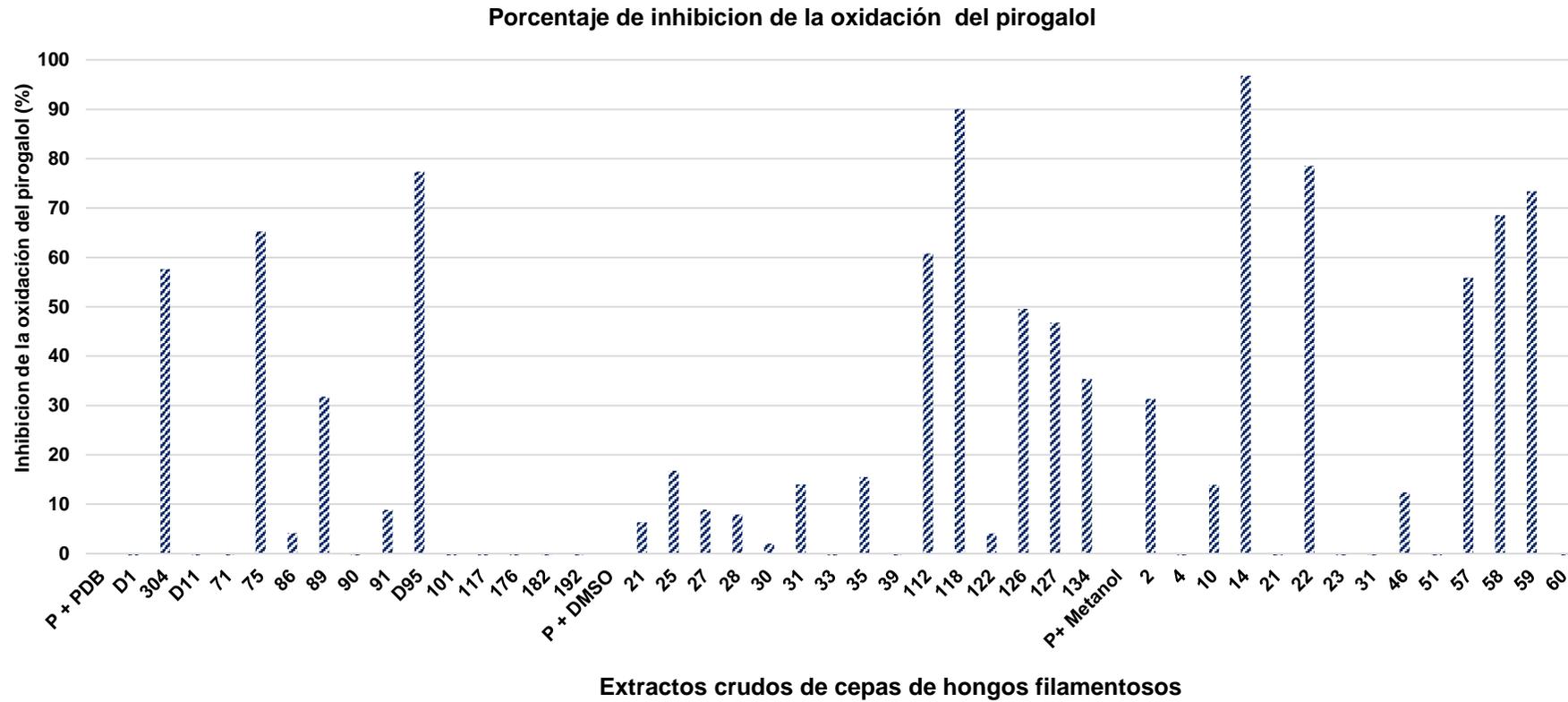


Figura 2. Porcentaje de inhibición de la oxidación del pirogalol con extractos de hongos filamentosos aislados del Estado de México, se presentan 44 extractos más representativos El porcentaje de inhibición de la oxidación fue determinado con la fórmula: $\% \text{ inhibición} = 100 - \left(\frac{\text{abs fn} \times 100}{\text{abs ctl}} \right)$. Donde *abs fn* es igual a la diferencia entre absorbancia final y la inicial, siendo los controles negativos: Pirogalol+DMSO, Pirogalol+PDB, Pirogalol+Metanol.

Obtención y fraccionamiento de los extractos

Se obtuvieron 39 fracciones de los 14 extractos activos (14 de hexano, 14 de acetona y 11 de metanol).

Medición de la actividad antioxidante en carne de pollo con el ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se encontraron diferencias estadísticas en los porcentajes de inhibición de la oxidación del pirogalol (Anova $p < 0.05$). Las 39 fracciones fueron evaluadas en el ensayo TBARS, de las cuales 28 presentaron porcentajes de inhibición de la oxidación mayores al control (ácido ascórbico), (Figura 3), las fracciones de hexano de los extractos de las cepas 57, 58 y 127, tuvieron un porcentaje de inhibición de 45, 40 y 47% respectivamente; de las fracciones de acetona de las cepas 10, 58, 118. Y 304 tuvieron un porcentajes de inhibición de 41, 40, 42 y 43%; por otro lado las fracciones de metanol de las cepas 14, 58 y 304 tuvieron porcentajes de inhibición de 40, 42 y 46%. Diversos autores obtuvieron actividad antioxidante de fracciones de extractos de hongos, por ejemplo, Hameed *et al.* (2017)²⁴ obtuvieron un 65% de inhibición de la oxidación en las fracciones etanolicas y acuosas de *Mucor circinelloides* mediante β caroteno ABTS, FRAP, por otro lado Sugiharto *et al.* 2016²⁵ consiguió un 90% de inhibición de oxidación con extractos metanólicos de *Acremonium charticola*; Nitya *et al.* (2010)²⁶ reportaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillium* aislados de *Lobelia nicotianifolia* en donde usaron concentraciones de 160, 240, 220, 320 hasta llegar a los 800 μ g para obtener un porcentaje de inhibición mayores a 80% (porcentajes y concentraciones mayores a las utilizadas en este estudio); Schmidt *et al.* (2014)²⁷, reportaron la actividad antioxidante del hongo *Rizhopus oryzae*, de acuerdo a su tiempo de fermentación, utilizaron metanol para obtener el extracto e hicieron lavados con hexano para purificar los compuestos antioxidantes que en su mayoría eran compuestos fenólicos que iban incrementando hasta las 120 horas (5 días) en donde se disminuyó la producción de dichos metabolitos, a diferencia de las cepas del estudio que estuvieron cultivadas por 336 horas (14 días) y fueron fraccionadas solo en 3 polaridades.

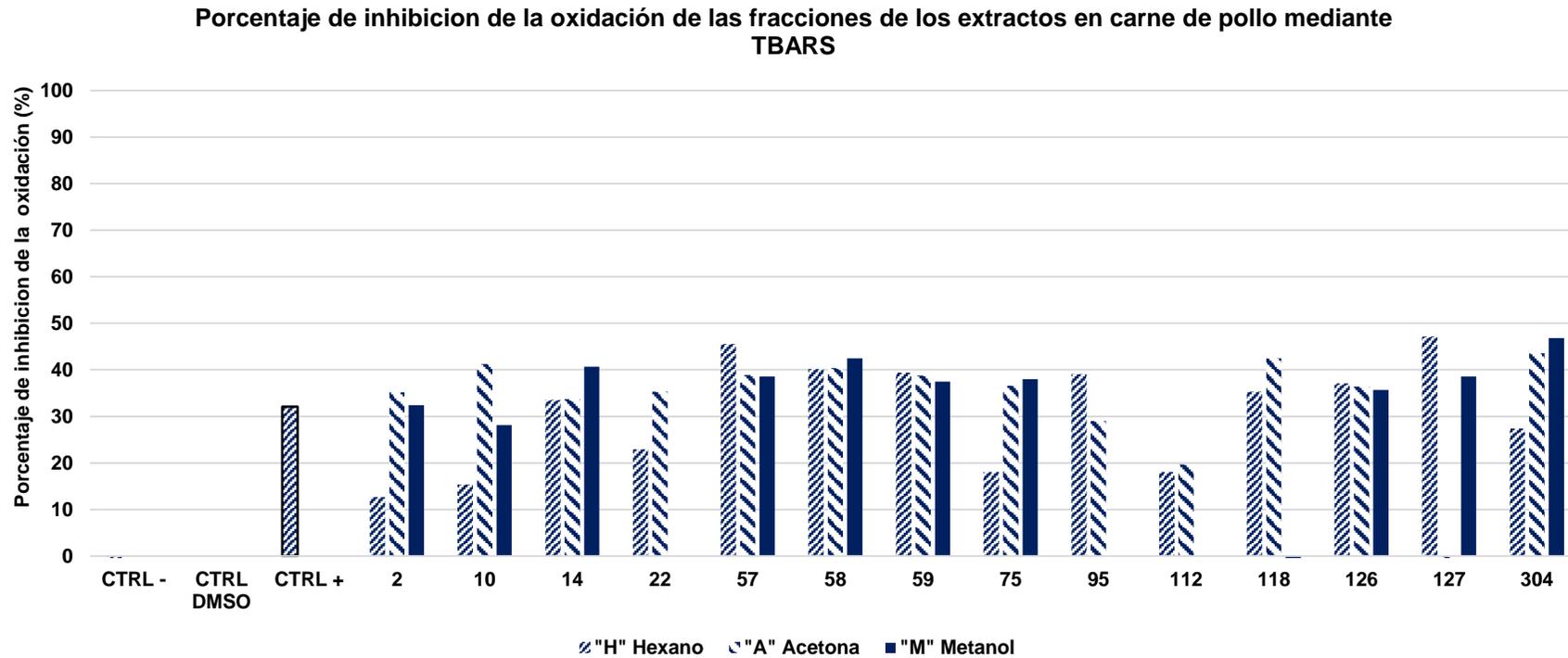


Figura 3. Porcentaje de inhibición de la oxidación en las 37 fracciones de extractos de hongos filamentosos en la carne molida cruda de pollo. CTRL- = Control negativo, carne de pollo sin tratamiento. CTRL DMSO= Control negativo, carne de pollo tratada con Dimetilsulfoxido. CTRL+= Control positivo, carne de pollo tratada con ácido ascórbico disuelto en DMSO. ▨ Fracción de Hexano. ▩ =Fracción de Acetona. ■ = Fracción de Metanol. $\% inhibicion = 100 - \left(\frac{abs\ fn \times 100}{abs\ ctl}\right)$ donde *abs fn*. Eses la diferencia entre la absorbancia final y la inicial.

Citotoxicidad de fracciones de extractos orgánicos de hongos filamentosos en fibroblastos

La citotoxicidad de las fracciones de hexano, acetona y metanol fue medida en una suspensión celular de 8000 células por cada 200 μ L. Las fracciones evaluadas presentaron una viabilidad celular <80%, excepto las fracciones de hexano de las cepas 127, y 58 que presentaron una viabilidad del 100 y 93% respectivamente (Figura 4). A comparación del compuesto Ter butil hidro quinona (TBHQ) (antioxidante comercial) que a concentraciones similares puede ser citotóxica²⁸.

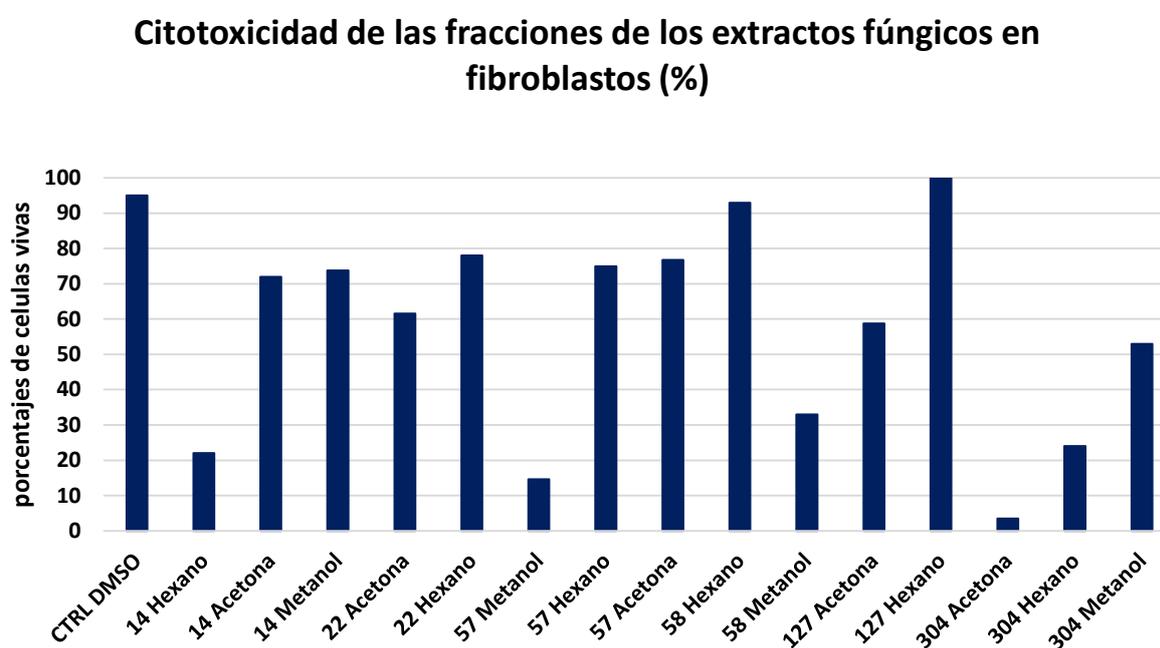
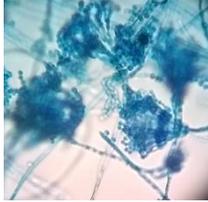
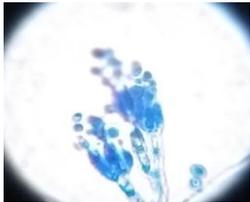
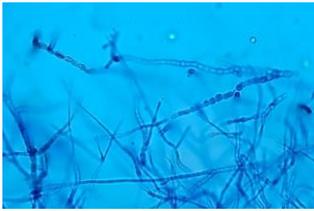
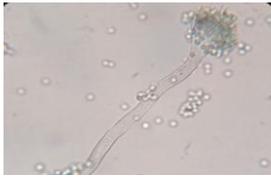


Figura 4. Citotoxicidad en fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), expuestos a las fracciones de extractos de hongos filamentosos (10 μ L de fracción, a una concentración 200mg/mL) a las 24h. CTRL DMSO= 8,000 células + 10 μ L de DMSO.

Identificación taxonómica de las cepas de hongos filamentosos productoras de compuestos con actividad antioxidante

Se identificaron 4 géneros: *Eudarluka* (cepa 127), *Aspergillus* (cepa 304), *Fusarium* (cepa 10) y *Penicillium* (cepa 2 y 118) (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción morfológica e identificación taxonómica de cepas de hongos filamentosos

Cepa	Género/especie	Descripción morfológica	Evidencia fotográfica
02	<i>Penicillium</i>	<p>Colonia blanca a grisacea, algodonosa, granular, umbilicada y de orilla ondulada y en ocasiones verdosa.</p> <p>Hifa septada, sin conexión tipo clamp, las esporas se forman en la parte apical de las fialdes la conidia es hialina, seca y bien desarrollada (los conidios están densamente peniciliados)</p>	
10	<i>Fusarium</i>	<p>Colonia blanca, circular, plana, con margen rosado y dentada.</p> <p>Hifa septada, sin conexión tipo clamp, las esporas formadas en fialides, que están en conidios, la conidia está formada por 2 células, los macroconidios están en forma ovalada y de luna.</p>	
118	<i>Penicillium</i>	<p>Colonias aisladas blancas, circulares, planas, enteras y con difuminación de pigmento rojizo.</p> <p>Hifa septada sin conexión tipo clamp, y que forma conidio que a su vez forma esporas en sus fialides, la conidia formada por una sola celula, no hialina y no globosa, los conidióforos están pobremente desarrollados, hialinos y secos y con forma penicilada.</p>	
127	<i>Eudarluca</i>	<p>Micelio aéreo algodonoso, gris, con periferia blanca ondulada y elevación convexa.</p> <p>Hifa septada, sin conexión tipo clamp, las esporas se encuentran dentro de la hifa (ascosporas), sin ascocarp y con esporas fragmentadas en 2, con Asci unitunicado con 2 celdas hialinas.</p>	
304	<i>Aspergillus</i>	<p>Colonias aisladas y puntiforme, convexa y dentada, color blanca y posterior de 7 días grisácea.</p> <p>Hifa septada, sin conexión clamp, conformación de esporas en conidios (deuteromycete), los conidios en forma de phialospora, formados en una sola estructura por hifa, las células apicales se encuentran infladas, y con gran número de fialides</p>	

7.1.8 Conclusiones

Derivado de la evaluación de la actividad antioxidante de 99 de cepas de hongos filamentosos aislados en el estado de México, 14 extractos presentan compuestos que determinan actividad antioxidante en la prueba de pirogalol, de los cuales 4 fracciones destacaron teniendo actividad antioxidante en la prueba con carne de pollo, recalcando la fracción de hexano de la cepa 127 y de la cepa 58 por su baja citotoxicidad los géneros de hongos filamentosos que se les atribuye la actividad antioxidante son *Aspergillus*, *Eudarluka*, *Penicillium* y *Fusarium*, La identificación molecular de los hongos, así como la identificación de los compuestos contenidos en los extractos nos permitiría enriquecer los resultados para la posible aplicación de los extractos como aditivos alimentarios.

7.1.9 Bibliografía

1. Badui Dergal S. Química de los alimentos. Química de los alimentos. 2006. 507–545 p.
2. Coronado M, Vega y León S, Gutiérrez R, Vázquez M, Radilla C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev Chil Nutr [Internet]. 2015;42(2):206–12. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014
3. Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant Activity of Essential Oils. J Agric food ... [Internet]. 2013;61(46):10835–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24156356> <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf403496k>
4. Choe E, & Min BD. Mechanisms of antioxidant in the oxidation of foods. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2009; 8:345–58.
5. C. Erickson M. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. second. Casimir C. Akoh DBM, editor. new york; 2002.
6. Corpas FJ, Freschi L, Rodríguez-Ruiz M, Mito PT, González-Gordo S, Palma JM. Nitro-oxidative metabolism during fruit ripening. J Exp Bot [Internet]. 2018;(January):1–15. Available from: <http://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erx453/4788293>
7. Kumar Y, Yadav DN, Ahmad T, Narsaiah K. Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2015;14(6):796–812.
8. Suh HJ, Chung MS, Cho YH, Kim JW, Kim DH, Han KW, *et al.* Estimated daily intakes of butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) antioxidants in Korea. Food Addit Contam. 2005;22(12):1176–88.
9. Tennant DR, Bruyninckx C. The Potential Application of European Market Research Data in Dietary Exposure Modelling of Food Additives. Food Addit Contam Part A [Internet]. 2017;0049(November):19440049.2017.1400187. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2017.1400187>
10. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of Certain Food Additives: Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

[Internet]. World Health Organization technical report series technical report series. 1999. p. 18–22. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je02.htm>

11. Conning DM, Phillips JC. Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *Food Chem Toxicol.* 1986;24(10–11):1145–8.
12. Kupfer R, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, Thompson JA. Lung toxicity and tumor promotion by hydroxylated derivatives of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 2-tert-butyl-4-methyl-6-iso-propylphenol: Correlation with quinone methide reactivity. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(8):1106–12.
13. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(1):33–9.
14. Solomon E, Berg L, Martin D. *Biología.* 2013. 1260 p.
15. Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. Biodiversidad de hongos en México. *Rev Mex Biodivers.* 2014;85(SUPPL.):76–81.
16. Leitão AL, Enguita FJ. Fungal extrolites as a new source for therapeutic compounds and as building blocks for applications in synthetic biology. *Microbiol Res [Internet].* 2014;169(9–10):652–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.007>
17. Elvira Sánchez-Fernández R, Lorena Sánchez-Ortiz B, Monserrat Sandoval-Espinosa YK, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, Claudia García-Méndez M, *et al.* Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip [Internet].* 2013;16(2):132–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1405888X13720849>
18. Egea J, Fabregat I, Frapart YM, Ghezzi P, Görlach A, Kietzmann T, *et al.* European contribution to the study of ROS. *Redox Biol [Internet].* 2017;13(May):94–162. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717303373>
19. Marklund S, Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. 1974;474:469–74.
20. Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi Morphologies of cultured fungi and key to species. segunda ed. Press C, editor. 2002.
21. H. B& BH. *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi.* 4 ed. 1998. 218 p.
22. Sharma S, Gupta S, Dhar MK, Kaul S. Diversity and Bioactive Potential of Culturable Fungal Endophytes of Medicinal Shrub *Berberis aristata* DC .: A First Report. *Mycobiology [Internet].* 2018;46(4):370–81. Available from: <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1538068>
23. Daljit Singh Arora* PC, Microbial. Assay of Antioxidant Potential of Two *Aspergillus* Isolates By Different Methods Under. *brazilian J Microbiol.* 2010;41(91):765–77.
24. Hameed A, Hussain SA, Yang J, Ijaz MU, Liu Q, Ansar H, *et al.* Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi. 2017;1–20.
25. Sugiharto S, Yudiarti T, Isroli I. Assay of Antioxidant Potential of Two Filamentous Fungi Isolated from the Indonesian Fermented Dried Cassava. *Antioxidants [Internet].* 2016;5(1):6. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/5/1/6>
26. Nitya. K. Murthy KCP and CGJ. Antioxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from *Lobelia nicotianifolia*. 2010;2(3):567–74.
27. Schmidt CG, Gonçalves LM, Prietto L, Hackbart HS, Furlong EB. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*.

Food Chem [Internet]. 2014;146:371–7. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.101>

28. Naoi T, Shibuya N, Inoue H, Mita S, Kobayashi S, Watanabe K. The Effect of tert - Butylhydroquinone-Induced Oxidative Stress in MDBK Cells using XTT Assay : Implication of tert -Butylhydroquinone-Induced NADPH Generating Enzymes. 2009;2–7.

8. DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes es necesaria para poder brindar alternativas a la industria alimentaria. Los hongos filamentosos son organismos que producen una gran variedad de proteínas, metabolitos secundarios, péptidos y enzimas que tienen posibles aplicaciones para la industria y la ciencia^{55,56}. De acuerdo a Yadav *et al* (2015)⁴, se encuentran aproximadamente 8600 compuestos terapéuticos obtenidos de hongos con aplicaciones industriales, entre estos compuestos se pueden encontrar fenoles y poli fenoles^{63,68}, se ha encontrado una correlación entre la cantidad de fenoles y la actividad antioxidante. Yadav *et al.* (2014)⁶⁸, encontraron y correlacionaron la actividad antioxidante de los compuestos obtenidos de hongos endófitos de *Eugenia jambolana* con la cantidad de fenoles, obteniendo que el hongo *Aspergillus* sp. produce compuestos fenólicos y flavonoides con los que obtuvieron un 80% de inhibición, que es mayor al reportado por la cepa *Aspergillus* sp. (304) del presente proyecto. Prihantini y Tachibana (2017)⁶³, concluyeron la presencia de compuestos fenólicos mediante la utilización de rayos X y cristalografía en distintas fracciones del extracto del hongo *Pseudocercospora* sp., endófito de *Elaeocarpus sylvestris*, donde el extracto con mayor porcentaje de inhibición fue del 64%, mediante el ensayo de β caroteno, la diferente metodología utilizada para detectar esta actividad, puede influir en los porcentajes obtenidos⁶³ El ensayo de la actividad antioxidante con pirogalol fue diseñado por Marklund y Marklund⁴⁶, de acuerdo con Seok *et al.* (2014)⁸⁴, el método del análisis está basado principalmente en la inhibición de la auto-oxidación del pirogalol y es catalizado por un radical súper oxido. Li (2012)⁴⁴ determinó que es un ensayo confiable, económico y útil para cualquier tipo de antioxidante, comparada con las metodologías de DPPH y ABTS; sin embargo Zhang *et al* (2016)⁷⁵ al hacer una comparación con otros métodos, destacó que es un método en el cual se debe considerar la estructura y propiedades del antioxidante. Este método ha sido utilizado para medir la capacidad antioxidante de fluidos corporales, como el semen⁸⁵ y de extractos obtenidos de la fermentación de los polisacáridos de la raíz de *Panax ginseng* con *Lactobacillus plantarum*. Chandra y Arora (2009)²² argumentan que una prueba antioxidante no es suficiente para evaluar la capacidad antioxidante total, por ello se realizó una prueba de TBARS, basada la detección de malondialdehído (MDA), esta prueba es efectiva para la determinación de productos derivados de la oxidación de los lípidos, es precisa, sensible y la espectrofotometría lo convierte en una determinación cuantitativa del MDA⁴⁹. Esta prueba se utilizado para medir la capacidad antioxidante

del aceite de orégano en carne de pollo⁸⁶ y del extracto acuoso de *Enterococcus faecium* en aceite de oliva extra virgen⁸⁷. De acuerdo a Ahsan *et al.* (2017)⁸⁸ esta prueba es útil para la determinación de la actividad antioxidante en carne.

Los porcentajes de inhibición de la oxidación del pirogalol obtenidos en este proyecto (96%) son similares a lo reportados por Sharma *et al.* (2018)⁸⁹, 80% (fracción de acetato de etilo) de *Aspergillus* sp. que utilizó el reactivo DPPH; Sugiharto *et al.* 2016²¹, 90%, (extractos metanólicos) de *Acremonium charticola*; Hameed *et al.* (2017)⁸⁸, 65% (fracciones etanólicas y acuosas) de *Mucor circinelloides* mediante β caroteno ABTS, FRAP; Murthy *et al.* (2010)⁷¹ reportaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillium* aislados de *Lobelia nicotianifolia* donde usaron concentraciones de 160, 240, 220, 320 hasta llegar a los 800 μ g para obtener un porcentaje de inhibición mayores a 80%; (concentraciones mayores a las utilizadas en este estudio); Schmidt *et al.* (2014)⁶⁷, reportaron la actividad antioxidante del hongo *Rizhopus oryzae*, monitoreando su tiempo de fermentación, utilizaron metanol para obtener el extracto e hicieron lavados con hexano para purificar los compuestos antioxidantes que en su mayoría eran compuestos fenólicos que iban incrementando hasta las 120 horas (5 días) en donde se disminuyó la producción de dichos metabolitos, a diferencia de las cepas del estudio que estuvieron cultivadas por 336 horas (14 días); Daljit *et al.* (2010)⁷³ reportaron actividad antioxidante de 82% de extractos provenientes de *Aspergillus*, sin embargo utilizó caldo Czapek dox, y lo mantuvo en incubación por 10 días a 25°C a diferencia de las condiciones en las que fueron cultivados los hongos (26°C durante 14 días en condiciones de oscuridad y sin agitación). Los diferentes porcentajes de la actividad antioxidante pueden variar debido a la cantidad y funcionalidad de los compuestos antioxidantes producidos por los hongos además están directamente relacionados con las condiciones de la obtención del extracto⁸⁸: incubación, temperatura, PH, condiciones de luz y sustrato. Asimismo de los disolventes utilizados para la obtención del extracto, entre ellos destaca el acetato de etilo del cual se obtiene el mejor rendimiento para la extracción de fenoles de bajo y alto peso molecular, seguido por el cloroformo y butanol⁷³.

Las cepas de *Aspergillus* reportadas por Li y Wang (2017)⁹⁰ tuvieron un contenido de polifenoles mayor al 60% lo que atribuye su actividad antioxidante, por ejemplo el *A. Carbunarus* y *A. niger* tuvieron un porcentaje de radical scavenging (inhibición de la oxidación) del 60%, que es mayor que los obtenidos por la fracción de metanol de la cepa *Aspergillus* sp. (304) que tuvo un 46.8% en la prueba de TBARS en las mismas.

Respecto a la toxicidad, los valores de viabilidad celular encontrados en las fracciones de hexano de las cepas 127 y 58 sugieren una baja citotoxicidad, en una concentración de 200mg/ml, a concentraciones similares, Naoi *et al.* (2009)⁹¹, determinaron que el antioxidante comercial TBHQ puede ser citotóxica.

9. CONCLUSIONES GENERALES

- Se reactivaron un total de 99 cepas y se obtuvieron sus extractos orgánicos.
- Un total de 25 extractos crudos inhibieron la oxidación del pirogalol en más del 6%, más de 10 extractos en más del 30%.
- Se obtuvieron 39 fracciones: 14 de Hexano, 14 de Acetona y 11 de Metanol, de los cuales 28 fracciones presentaron inhibición de la oxidación en más del 32%.
- Las fracciones de hexano (cepas 57, 58,127); de acetona (cepas 10, 58, 118, 304) y metanol (cepas 14, 58, 304) fueron las más activas en carne de pollo (TBARS) con una inhibición de la oxidación >40%.
- Las fracciones de hexano de las cepas 58 y 127 no presentaron toxicidad en fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) con una viabilidad celular >92% (200 mg/mL).
- Las fracciones fúngicas que presentaron actividad antioxidante pertenecen a los géneros *Fusarium* (10), *Penicillium* (118"), *Eudarluka* (127) y *Aspergillus* (304), las cepas 14, 57 y 58 pertenecen a cepas fúngicas con micelio estéril.

9.1 Limitaciones

Aunque la actividad antioxidante de los extractos y fracciones fúngicas es concluyente, se desconoce cuáles son los posibles mecanismos de acción implicados que generan esta actividad.

9.2 Recomendaciones

Es necesario continuar con esta investigación utilizando técnicas específicas que determinen cuales son los compuestos o moléculas presentes en los extractos orgánicos de hongos filamentosos que proporcionan la actividad antioxidante.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Codex Alimentarius Commission. GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES CODEX STAN 192-1995-Rivision 2017. 2017;
2. Foundation IFIC, FDA F and DAU. Food Ingredients & Colors. US Food and Drug Administration [Internet]. 2010;1–8. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/ucm094249.pdf>
3. Badui Dergal S. Química de los alimentos. Química de los alimentos. 2006. 507–545 p.
4. Kumar Y, Yadav DN, Ahmad T, Narsaiah K. Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2015;14(6):796–812.
5. Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant Activity of Essential Oils. *J Agric food ...* [Internet]. 2013;61(46):10835–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24156356> <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf403496k>
6. Choi AO, Cho SJ, Desbarats J, Lovri J. Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. 2007;13:1–13.
7. Griffiths K, Aggarwal B, Singh R, Buttar H, Wilson D, De Meester F. Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases* [Internet]. 2016;4(3):28. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-9721/4/3/28>
8. Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J* [Internet]. 2017;90(5):856–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.13299>
9. Coronado M, Vega y León S, Gutiérrez R, Vázquez M, Radilla C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2015;42(2):206–12. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014
10. Aladedunye F, Przybylski R, Niehaus K, Bednarz H, Matthäus B. Phenolic extracts from *Crataegus mordenensis* and *Prunus virginiana*: Composition, antioxidant activity and performance in sunflower oil. *LWT - Food Sci Technol*.

- 2014;59(1):308–19.
11. Ng KL, Tan GH, Khor SM. Graphite nanocomposites sensor for multiplex detection of antioxidants in food. *Food Chem.* 2017;237:912–20.
 12. Oswell NJ, Thippareddi H, Pegg RB. Practical use of natural antioxidants in meat products in the U.S.: A review. *Meat Sci.* 2018;145:469–79.
 13. Conning DM, Phillips JC. Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *Food Chem Toxicol.* 1986;24(10–11):1145–8.
 14. Kupfer R, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, Thompson JA. Lung toxicity and tumor promotion by hydroxylated derivatives of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 2-tert-butyl-4-methyl-6-iso-propylphenol: Correlation with quinone methide reactivity. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(8):1106–12.
 15. Suh HJ, Chung MS, Cho YH, Kim JW, Kim DH, Han KW, et al. Estimated daily intakes of butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) antioxidants in Korea. *Food Addit Contam.* 2005;22(12):1176–88.
 16. Tennant DR, Bruyninckx C. The Potential Application of European Market Research Data in Dietary Exposure Modelling of Food Additives. *Food Addit Contam Part A* [Internet]. 2017;0049(November):19440049.2017.1400187. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2017.1400187>
 17. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of Certain Food Additives: Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [Internet]. World Health Organization technical report series technical report series. 1999. p. 18–22. Available from:
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je02.htm>
 18. Victoria Urquiza-Martínez M, Fenton Navarro B. Antioxidant Capacity of Food. *Free Radicals Antioxidants* [Internet]. 2016;6(1):1–12. Available from:
<http://www.antiox.org/article/31>
 19. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2017;38(7):592–607. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
 20. Sugiharto S, Yudiarti T, Isroli I. Assay of Antioxidant Potential of Two

- Filamentous Fungi Isolated from the Indonesian Fermented Dried Cassava. Antioxidants [Internet]. 2016;5(1):6. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/5/1/6>
21. Chandra P, Arora DS. Antioxidant activity of fungi isolated from soil of different areas of Punjab , India. *J Appl Nat Sci*. 2009;1(2):123–8.
 22. Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015;16(11):26087–124. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/11/25942/>
 23. Kawamura T, Muraoka I. Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint. *Antioxidants* [Internet]. 2018;7(9):119. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/7/9/119>
 24. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* [Internet]. 2015;4:180–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
 25. Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol* [Internet]. 2016;8:205–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.010>
 26. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr J*. 2016;15(1):1–22.
 27. Egea J, Fabregat I, Frapart YM, Ghezzi P, Görlach A, Kietzmann T, et al. European contribution to the study of ROS. *Redox Biol* [Internet]. 2017;13(May):94–162. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717303373>
 28. Gerardo A, Flores V. Fundamentos de estrés oxidativo celular [Internet]. 1st ed. Aguascalientes: Universidad Autonoma de Aguascalientes; 2016. 142 p. Available from: https://www.uaa.mx/direcciones/dgdv/editorial/docs/zombis_fundamentos_estres_oxidativo_celular.pdf
 29. Corpas FJ, Freschi L, Rodríguez-Ruiz M, Mito PT, González-Gordo S, Palma JM. Nitro-oxidative metabolism during fruit ripening. *J Exp Bot* [Internet]. 2018;(January):1–15. Available from: <http://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erx453/4788293>

30. Choe E, & Min BD. Mechanisms of antioxidant in the oxidation of foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2009;8:345–58.
31. C. ERICKSON M. Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. In: Casimir C, Akoh. David B M, editor. *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* [Internet]. second. georgia; 2002. p. 383–430. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.200390077/abstract>
32. Grobbel JP, Dikeman ME, Hunt MC, Milliken GA. Effects of different packaging atmospheres and injection-enhancement on beef tenderness, sensory attributes, desmin degradation, and display color. *J Anim Sci.* 2008;86(10):2697–710.
33. Conchillo A, Valencia I, Puente A, Ansorena D, Astiasarán I. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutr Hosp.* 2006;21(3):369–73.
34. Sun J, Sun L, Meng Y, Yang X, Guo Y. Antioxidant activities of young apple polyphenols and its preservative effects on lipids and proteins in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets. *CyTA - J Food* [Internet]. 2017;15(2):291–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2016.1250110>
35. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Valadez-Blanco R, Hernández-Carlos B, Guadarrama-Mendoza PC. Natural antioxidant extracts as food preservatives. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2017;16(4).
36. Barbosa-Pereira L, Aurrekoetxea GP, Angulo I, Paseiro-Losada P, Cruz JM. Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. *Meat Sci* [Internet]. 2014;97(2):249–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.006>
37. Barbosa-Pereira L, Aurrekoetxea GP, Angulo I, Paseiro-Losada P, Cruz JM. Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. *Meat Sci.* 2014;97(2):249–54.
38. Augustyniak A, Bartosz G, Čipak A, Duburs G, Horáková L, Łuczaj W, et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radic Res* [Internet]. 2010;44(10):1216–62. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2010.508495>
39. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin Sci* [Internet]. 1993;84(4):407–

12. Available from: <http://ppclinsci.highwire.org/lookup/doi/10.1042/cs0840407>
40. Pérez-Jiménez J. Metodología para la Evaluación de Ingredientes Funcionales Antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. 2011;272. Available from: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1671/6494_perez_jimenez_jar_a.pdf?sequence=1
41. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay. *Methods Enzym.* 1999;299:15–36.
42. Ordoudi SA, Tsimidou MZ. Crocin bleaching assay step by step: Observations and suggestions for an alternative validated protocol. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1663–71.
43. Li X. Improved pyrogallol autoxidation method: A reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2012;60(25):6418–24.
44. Teke GN, Lunga PK, Wabo HK, Kuate JR, Vilarem G, Giacinti G, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of methanol extract, fractions and compounds from the stem bark of *Entada abyssinica* Steud ex A. Satabie. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2011;11(1):57. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/57>
45. Marklund S, Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. 1974;474:469–74.
46. Fernández J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López JA. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* 1997;59(3):345–53.
47. Ghani MA, Barril C, Bedgood DR, Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem* [Internet]. 2017;230:195–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>
48. Zeb A, Ullah F. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. *J Anal Methods Chem.* 2016;2016:1–5.
49. Madigan MT, John M M, Kelly S B, Daniel H B, David A S. *Brock Biology of Microorganisms.* 14th ed. United States of America: Pearson; 2015. 1041 p.
50. Solomon E, Berg L, Martin D. *Biología.* 2013. 1260 p.

51. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(1):33–9.
52. Abarca GH. Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en iberoamerica. 1a ed. Abarca GH, editor. Xalapa, Ver, México: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED); 2008. 7–10 p.
53. Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. Biodiversidad de hongos en México. *Rev Mex Biodivers*. 2014;85(SUPPL.):76–81.
54. Leitão AL, Enguita FJ. Fungal extrolites as a new source for therapeutic compounds and as building blocks for applications in synthetic biology. *Microbiol Res* [Internet]. 2014;169(9–10):652–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.007>
55. Elvira Sánchez-Fernández R, Lorena Sánchez-Ortiz B, Monserrat Sandoval-Espinosa YK, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, Claudia García-Méndez M, et al. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip* [Internet]. 2013;16(2):132–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1405888X13720849>
56. Gerke J, Braus GH. Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(20):8443–55.
57. Nielsen JC, Nielsen J. Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: Linking genomics and metabolism. *Synth Syst Biotechnol* [Internet]. 2017;2(1):5–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X17300066>
58. Bills GF, Gloer JB. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016;4(6). Available from: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016>
59. Fangio MF, Fritz R. Potential use of a bacteriocin-like substance in meat and vegetable food biopreservation. *Int Food Res J*. 2014;21(2):677–83.
60. Elaasser MM, Abdel-aziz MM. Antioxidant , antimicrobial , antiviral and antitumor activities of pyranone derivative obtained from *Aspergillus candidus*. *Microbiology*. 2011;1(4):5–17.

61. Islam T, Yu X, Xu B. Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2016;72:423–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.005>
62. Prihantini AI, Tachibana S. Antioxidant compounds produced by *Pseudocercospora* sp. ESL 02, an endophytic fungus isolated from *Elaeocarpus sylvestris*. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2017;7(2):110–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.020>
63. Khiralla A, Mohamed I, Thomas J, Mignard B, Spina R, Yagi S, et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med*. 2015;8(9):701–4.
64. Smith H, Doyle S, Murphy R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chem* [Internet]. 2015;185:389–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.134>
65. Cui JL, Guo TT, Ren ZX, Zhang NS, Wang ML. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118204>
66. Schmidt CG, Gonçalves LM, Prietto L, Hackbart HS, Furlong EB. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chem* [Internet]. 2014;146:371–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.101>
67. Yadav M, Yadav A, Yadav JP. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(S1):S256–61.
68. Karmakar R, Kumar S, Prakash HS. Fungal Endophytes From *Garcinia* Species. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;5(3):889–97.
69. Borderes J, Costa A, Guedes A, Tavares LBB. Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2011;54(6):1167–74.
70. Nitya. K. Murthy KCP and CGJ. Antioxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from *Lobelia nicotianifolia*. 2010;2(3):567–74.
71. K. Srinivasan*, L.K. Jagadish RS and JM, Center. Antioxidant a Ctivity of Endophytic Fungus.Isolated from *Guazama Tomentosa*. *Nano*. 2010;2(6):37–41.

72. Daljit Singh Arora* PC, Microbial. Assay of Antioxidant Potential of Two Aspergillus Isolates By Different Methods Under. *brazilian J Microbiol.* 2010;41(91):765–77.
73. Organization WH. cardiovascular diseases [Internet]. 2017. Available from: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
74. Zhang Q-A, Wang X, Song Y, Fan X-H, García Martín JF. Optimization of Pyrogallol Autoxidation Conditions and Its Application in Evaluation of Superoxide Anion Radical Scavenging Capacity for Four Antioxidants. *J AOAC Int* [Internet]. 2016;99(2):504–11. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1060-3271&volume=99&issue=2&spage=504>
75. Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspect en Nutr Humana* [Internet]. 2014;16(1):25–36. Available from: <http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/nutricion/article/view/20310>
76. Maria Francisca Colom, Manuel Sanchez, Ana Belen Martín MT. Preparación de microcultivos [Internet]. España; 2012. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=FHdsMH8p-IE>
77. Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi Morphologies of cultured fungi and key to species. segunda ed. Press C, editor. 2002.
78. H. B& BH. *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi*. 4 ed. 1998. 218 p.
79. Salud S de. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-065-SSA1-1993, QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES SANITARIAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO. [Internet]. 1993. Available from: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/065ssa13.html>
80. Naturales. S de MA y R. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud Ambiental – Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo. [Internet]. 2002. Available from: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
81. ONU O de las NU. Declaración de Rio sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo. 1992;1972:1–5. Available from: <http://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/riodeclaration.htm>
82. Secretaría del convenio de Diversida Biológica O. Protocolo de Cartagena sobre

- Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2000;19. Available from:
<https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/cartagena-protocol-es.pdf>
84. Kim SJ, Han D, Moon KD, Rhee JS, Kim S, Han D, et al. Measurement of Superoxide Dismutase-like Activity of Natural Antioxidants Measurement of Superoxide Dismutase-like Activity of Natural Antioxidants. 2014;8451.
 85. Gallardo JM. Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal. 2007;59(1):42–7.
 86. Scramlin SM, Newman MC, Cox RB, Sepe HA, Alderton AL, O’Leary J, et al. Effects of Oregano Oil Brine Enhancement on Quality Attributes of Beef Longissimus dorsi and Semimembranosus Muscles from Various Age Animals. *J Food Sci.* 2010;75(2).
 87. Pieniz S, Andrezza R, Okeke BC, Camargo FAO, Brandelli A. Antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus species isolated from meat and dairy products. 2015;75(4):923–31.
 88. Hameed A, Hussain SA, Yang J, Ijaz MU, Liu Q, Ansar H, et al. Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi. 2017;1–20.
 89. Sharma S, Gupta S, Dhar MK, Kaul S. Diversity and Bioactive Potential of Culturable Fungal Endophytes of Medicinal Shrub *Berberis aristata* DC .: A First Report. *Mycobiology* [Internet]. 2018;46(4):370–81. Available from: <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1538068>
 90. Li H, Wang Z. Comparison in antioxidant and antitumor activities of pine polyphenols and its seven biotransformation extracts by fungi. 2017;
 91. Naoi T, Shibuya N, Inoue H, Mita S, Kobayashi S, Watanabe K. The Effect of tert -Butylhydroquinone-Induced Oxidative Stress in MDBK Cells using XTT Assay : Implication of tert -Butylhydroquinone-Induced NADPH Generating Enzymes. 2009;2–7.