

Determinación de la actividad antioxidantes por el método DPPH y ABTS en hongos comestibles

Miguel Ángel Cuapio-Rodríguez¹, Yudimar López Domínguez¹, Jhuremy Alexandra Moreno Hernández¹, Lilia Sánchez Minutti¹, Raquel García-Barrientos¹, Ericka Santacruz Juárez¹ y Luis Alberto Santiago-Santiago¹.

¹Laboratorio de Cuerpo Académico de Tecnologías Químico-Biológicas, Universidad Politécnica de Tlaxcala, Av. Universidad Politécnica No. 1, San Pedro Xalcaltzinco, Tepeyanco, Tlaxcala. C.P. 90180, México. luisalbeto.santiago@uptlax.edu.mx.

Resumen

Los antioxidantes, ya sean naturales o sintéticos, desempeñan un papel crucial en la prevención del daño celular y se encuentran en una variedad de alimentos, incluyendo frutas, verduras, hortalizas y especialmente hongos. El cultivo de hongos puede llevarse a cabo en diferentes sistemas y condiciones, como fermentaciones sólidas y líquidas, con variaciones en pH, agitación, entre otros. Estos métodos permiten la obtención y recuperación de metabolitos con diversos usos en áreas como la alimentación, la farmacología, la medicina, la ecología y la agricultura. Optimizar los sistemas de cultivo puede incrementar los rendimientos de biomasa, la producción de biomoléculas y reducir los costos. En este estudio, se evaluaron dos métodos para determinar la actividad antioxidante utilizando los reactivos DPPH• y ABTS•+, y tres compuestos de referencia: ácido cafeico, ácido gálico y trolox. Posteriormente, se investigó la producción de antioxidantes en fermentación líquida utilizando dos cepas de hongos: *Pleurotus ostreatus* y *Cantharellus cibarius*. Se comparó la sensibilidad y correlación de ambas metodologías, demostrando que el uso del reactivo Trolox resulta más adecuado para determinar la concentración de biomoléculas en extractos miceliarios de las cepas mencionadas. Además, se realizó la lisis de la biomasa obtenida del cultivo en frascos para las cepas de *P. ostreatus p83*, *P. ostreatus CL* y *C. cibarius* mediante sonicación con etanol/agua 60:40 v/v. Los sobrenadantes resultantes se almacenaron a 4°C para su análisis posterior, lo que permite una evaluación exhaustiva de la actividad antioxidante de los extractos. Los resultados obtenidos muestran una actividad antioxidante de *C. cibarius*, *P. ostreatus CL* y *P. ostreatus p83* con los tres compuestos de referencia tanto por el método DPPH• como ABTS•+ son comparables con los valores reportados en bibliografía.

Palabras clave: Antioxidante, actividad antioxidante, curva de calibración, solución madre.

Abstract

Antioxidants, whether natural or synthetic, play a crucial role in the prevention of cell damage and are found in a variety of foods, including fruits, vegetables and especially mushrooms. Mushroom cultivation can be carried out in different systems and conditions, such as solid and liquid fermentations, with variations in pH, agitation, among others. These methods allow obtaining and recovering metabolites with diverse uses in areas such as food, pharmacology, medicine, ecology and agriculture. Optimizing cultivation systems can increase biomass yields, biomolecule production and reduce costs.

In this study, two methods were evaluated to determine antioxidant activity using DPPH- and ABTS-+ reagents and three reference compounds: caffeic acid, gallic acid and trolox. Subsequently, the production of antioxidants in liquid fermentation was investigated using two fungal strains: *Pleurotus ostreatus* and *Cantharellus cibarius*. The sensitivity and correlation of both methodologies were compared, demonstrating that the use of the Trolox reagent is more suitable for determining the concentration of biomolecules in mycelial extracts of the mentioned strains. In addition, lysis of the biomass obtained from the flask culture was performed for *P. ostreatus p83*, *P. ostreatus CL* and *C. cibarius* strains by sonication with 60:40 v/v ethanol/water. The resulting supernatants were stored at 4°C for subsequent analysis, allowing a comprehensive evaluation of the antioxidant activity of the extracts. The results obtained show antioxidant activity of *C. cibarius*, *P. ostreatus CL* and *P. ostreatus p83* with the three reference compounds by DPPH- and ABTS-+ methods are comparable with values reported in the bibliography.

Keywords: antioxidant, antioxidant activity, calibration curve, calibration curve, stock solution.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos se definen como organismos vivos que se reproducen por esporas y que carecen de clorofila, algunos hongos se caracterizan por vivir a costa de otros seres, haciéndolo de forma saprofitica, simbiótica o parásita [1]. Actualmente han sido descritas unas 80.000 especies de hongos, sin embargo, se estima que podrían existir aproximadamente 1.5 millones [2]. De las especies conocidas, aproximadamente el 50% podrían ser comestibles, de éstas, alrededor de 2000 lo son con toda seguridad, y alrededor de 700 especies son conocidas por sus importantes propiedades farmacológicas [3],[4].

China es el país con el registro histórico antiguo y moderno más importante en el uso de hongos, no solo por sus propiedades nutritivas y sabor, sino también por sus propiedades curativas y son empleados en algunas terapias tradicionales [5]. Aunque el uso de hongos en diversos países tiene una larga historia, en los países occidentales ha aumentado su popularidad en las últimas décadas. Se estima que el mercado mundial de hongos comestibles tiene un valor de 42000 millones de dólares al año [6].

Los basidiomicetos son el segundo grupo más grande de los hongos y en su mayoría son macroscópicos e incluye los conocidos hongos agaricales dentro de los que se encuentran algunas de las setas comestibles más conocidas [7]. Al menos

350 especies de hongos se consumen como alimento y dentro de los hongos basidiomicetos más consumidos se encuentran el hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) y una especie silvestre (*Cantharellus cibarius*) [8].

Los metabolitos primarios y secundarios se pueden producir tanto del micelio como del cuerpo fructífero y también del medio de cultivo empleado. Dentro de estos metabolitos se encuentran: β -glucanos, enzimas, polipéptidos, policétidos, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides y terpenoides, entre otros. Algunas de las propiedades atribuidas a estos compuestos son: anticancerígenas, antitumorales, hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, o inmunomoduladoras, entre otras [9], [10], [11], [12].

El cultivo de hongos se puede llevar a cabo bajo diferentes sistemas, como las fermentaciones sólidas y líquidas y a través de ellas se pueden recuperar metabolitos de interés. La optimización de los sistemas de cultivo puede garantizar mayores rendimientos de biomasa, producción de biomoléculas y una reducción del costo del proceso.

En el presente trabajo se evaluó la implementación de una metodología para cuantificar la producción de antioxidantes en fase micelial de tres cepas de hongos: *Pleurotus ostreatus CL*, *P. ostreatus p83* y *Cantharellus cibarius*,

La capacidad antioxidante de un compuesto se evalúa mediante el uso de diferentes métodos cuyo fundamento es la cuantificación del producto de reacción entre una especie química inestable y el antioxidante de prueba. Los radicales usados para poder determinar la actividad antioxidante son 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) y ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS•+). Los porcentajes de inhibición por los ensayos anteriores son generalmente convertidos a equivalentes de ácido cafeico, o de ácido gálico o trolox (TE) [13].

El objetivo del trabajo fue determinar la mejor metodología en base a la curva de calibración y su correlación para determinar la sensibilidad usando tres estándares reactivos tales como ácido cafeico, ácido gálico y trolox, para con ello poder determinar la capacidad antioxidante a través de los ensayos de DPPH• y ABTS y el contenido de polifenoles totales presentes en extractos etanólicos de micelio de hongos comestibles.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material Biológico: Reactivación de las Cepas.

Se emplearon dos cepas de *Pleurotus ostreatus*: la cepa *CL* y la cepa *p83* y una cepa de *Cantharellus cibarius*, las cuales se cuenta con ellas en conservación en el laboratorio del cuerpo académico. Para su reactivación se inocularon en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), el cual se esterilizó a 15 lb/in² durante 15 min en una autoclave. Posteriormente se dejó enfriar y bajo condiciones de asepsia se vertió en cajas Petri. Las cajas fueron inoculadas por pellets con micelio de los hongos e incubadas a 25 °C en oscuridad durante 15 días hasta que el micelio invadió las cajas Petri.

B. Producción de inóculo en sustrato sólido.

Las cepas reactivadas, se transfirieron a frascos que contenían 150 g de sorgo, se ajustaron las condiciones de humedad para permitir la proliferación del micelio y se incubaron en oscuridad a una temperatura de 27°C durante 15 días. El grano de sorgo invadido con las cepas se utilizó como inóculo para la fermentación líquida en frascos.

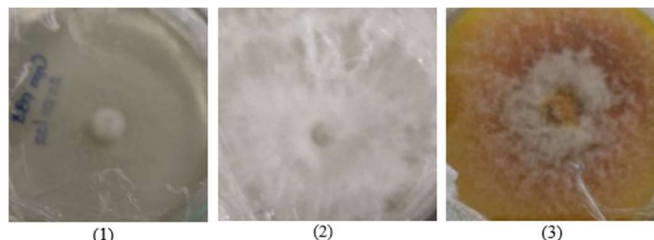


Fig. 1. Reactivación de las cepas de hongos. (1) *P. ostreatus p83*, (2) *P. ostreatus CL*, (3) *C. cibarius*.

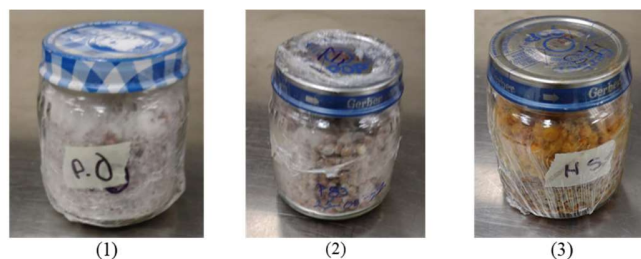


Fig. 2. Producción de inóculo de las cepas de hongo. (1) *P. ostreatus CL*, (2) *P. ostreatus p83* y (3) *C. cibarius*.

C. Obtención de extractos etanólicos.

La biomasa obtenida del cultivo en frascos para las cepas de *P. ostreatus p83*, *P. ostreatus CL* y *C. cibarius*. Fue lisada para su análisis. Se realizó con un sonicador de la marca UP400S, Hielscher, Teltow, Germany utilizando etanol/agua 60:40 v/v. Se ajustó a una amplitud al 100% y se sónico durante 10 min (24 Khz, 400 W), a una temperatura de 30-40 °C (el uso de un baño de agua fría o de hielo ayuda a mantener baja la temperatura de sonicación). Posteriormente se eliminaron los sólidos por centrifugación (1000 rpm a 4 °C por 10 min). Finalmente se almacenaron los sobrenadantes a 4°C para su respectivo análisis.

D. Elaboración de Curva de Calibración de Ácido Cafeico, Ácido Gálico y Trolox por el método DPPH•

Ensayo DPPH•. Las actividades antirradicales de varios antioxidantes se determinaron utilizando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) (SIGMA-ALDRICH®) [14], [15] mediante la reacción de una solución stock del radical a 0.1 mM (0.39 mg) se aforó a 10 mL de metanol al 80%.

Se realizaron 3 curvas de calibración con soluciones estándar 0.01 mM de Ácido Cafeico (0.018 mg en 10 mL de metanol al 80%), Ácido Gálico (0.017 mg en 10 mL de metanol al 80%) y Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)

(0.025 mg en 10 mL de metanol al 80%) a partir de la cual se obtuvieron concentraciones en un intervalo de 0–10 μM . Dichas mezclas se dejaron reaccionar durante 30 min, posteriormente las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca Jenway 6405UV/Vis a una absorbancia de 517 nm [16], [17].

Finalmente, para la obtención del porcentaje de inhibición se ha utilizado la siguiente fórmula:

$$\%inhibición = \frac{AP-AM}{AP} \cdot 100\% \quad (1)$$

En donde AP= Absorbancia del Blanco y AM= Absorbancia de la muestra.

E. Elaboración Curva de Calibración de Ácido Cafeico, Ácido Gálico y Trolox por el método del ABTS•+

Ensayo ABTS•+. La capacidad antioxidante se evaluó con el método de ABTS•+ [18] el radical ABTS•+ se obtiene mediante la reacción de una solución stock de ABTS•+ ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (SIGMA-ALDRICH®) 7 mM (3.8 mg) se aforo en 1 mL persulfato potásico 2.45 mM (3.3 mg) misma que se encontraba aforada anteriormente en 5 mL de agua desionizada, la solución se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente por 12 h antes de su uso. Posteriormente se tomaron 150 μL de muestra y diluyó en 14 mL buffer de fosfatos (compuesta por 8 g NaCl, 0.2 g KCl y 1.44 g KH_2PO_4 contenido en 1 L de agua destilada) hasta obtener una absorbancia de 0.700 (± 0.020) a una longitud de máxima absorción de 734 nm (en caso de tener una absorbancia menor se recomienda adicionar más mL del radical, en caso contrario más cantidad de buffer) [18], [19]. Se realizaron 3 curvas de calibración con soluciones estándar de Ácido Cafeico (0.18 mg en 10 mL de etanol al 95%), Ácido Gálico (0.17 mg en 10 mL de etanol al 95%) y Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) 0.1 mM (0.25 mg en 10 mL de etanol al 95%) a partir de la cual se obtuvieron concentraciones en un intervalo de 0–90 μM . Dichas mezclas se dejaron reaccionar durante 6 min, posteriormente las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca Jenway 6405UV/Vis a una absorbancia de 734 nm [15], [19], [23].

Finalmente, para la obtención del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%inhibición = \frac{ABTS(t=0) - ABTS(t=6)}{ABTS(t=0)} \cdot 100\% \quad (2)$$

En donde ABTS (t=0) =absorbancia obtenida en el tiempo cero, ABTS (t=6) =absorbancia después de 6 minutos.

F. Preparación de extractos

Para comprobar cuál de las curvas se obtenía mejor determinación de concentración se evaluaron extractos provenientes de los micelios de 2 cepas de hongos comestibles, se colocaron 100 μL de cada muestra en una celda espectrofotométrica y se adicionaron 900 μL de DPPH [8].

Se realizó el mismo procedimiento antes mencionado, pero se adicionaron 1000 μL ABTS•+ [22].

III. RESULTADOS

A. Curvas de Calibración por Método del DPPH•

De cada una de las curvas de calibración se realizaron a partir de una solución madre 10 μM , mostrados en las Fig. 1, 2 y 3, todos los resultados de absorbancias se les calculó el porcentaje de inhibición por el radical DPPH• y determinar su correlación.

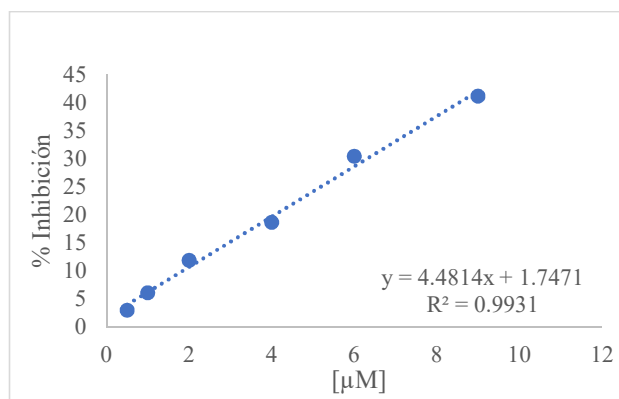


Fig. 3. Curva de Calibración de Ácido Cafeico por el método DPPH•.

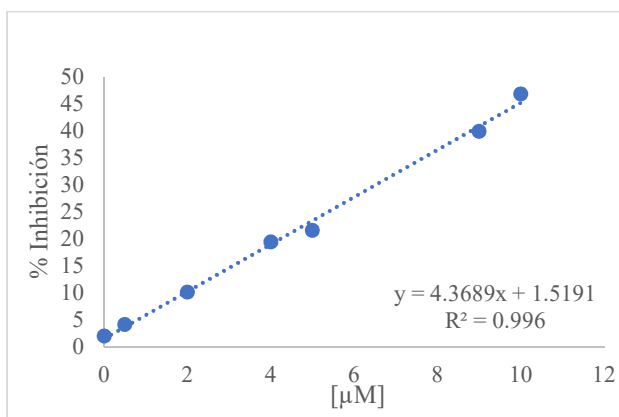


Fig. 4. Curva de Calibración de Ácido Gálico por el método DPPH•.

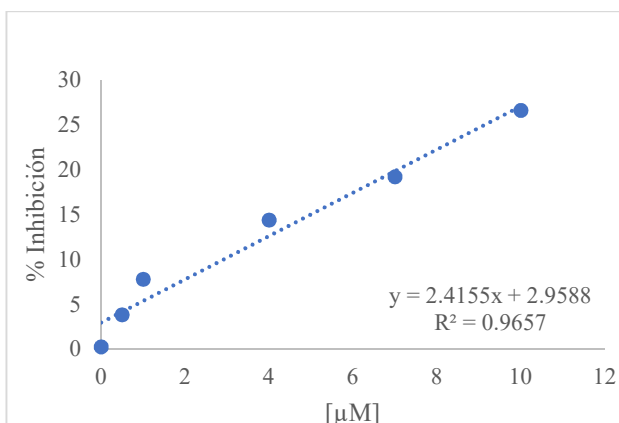


Fig. 5. Curva de Calibración de Trolox por el método DPPH•.

En las figuras anteriores se obtuvieron correlaciones de 0.993 para el ácido cafeico (fig. 3), 0.996 para el ácido gálico (fig. 4), 0.965 para el Trolox (fig. 5).

B. Curvas de Calibración por Método del ABTS•+

Para este segundo método la determinación antioxidante se realizó a partir de una solución madre de 100 μM , mostrados en las Fig. 4, 5 y 6. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición y se linealizaron los resultados, de las tres muestras realizadas.

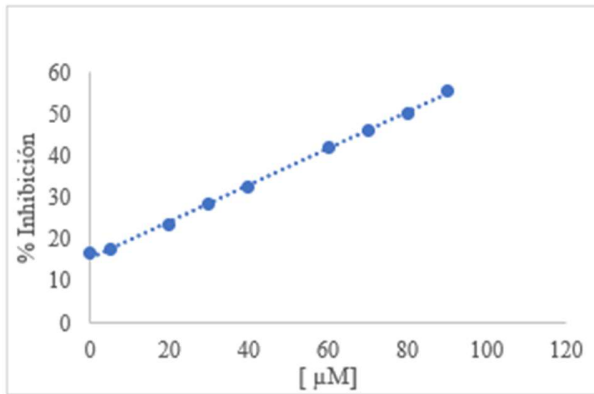


Fig. 6. Curva de Calibración de Ácido Cafeico por el método ABTS•+.

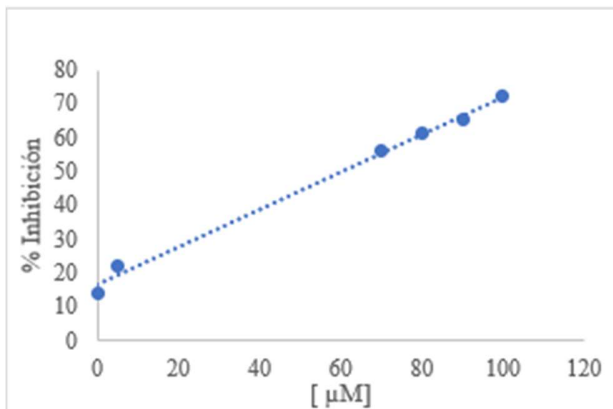


Fig. 7. Curva de Calibración de Ácido Gálico por el método ABTS•+.

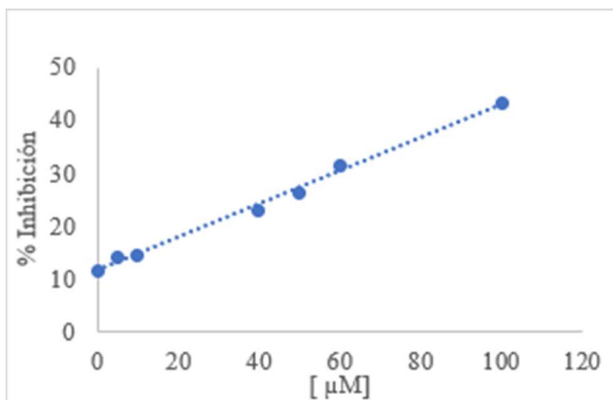


Fig. 8. Curva de Calibración de Trolox por el método ABTS•+.

En las Fig. 6, 7, 8 se obtuvieron correlaciones de 0.9938 para el ácido cafeico, 0.995 para el ácido gálico, 0.994 para el Trolox.

C. Determinación de concentraciones de extractos etanólicos de distintas cepas de hongos comestibles por radical DPPH•.

En las Tablas 1, 2 y 3 se indica el porcentaje de inhibición antioxidante, posteriormente con base a las curvas de calibración obtenidas de Ácido Cafeico, Ácido Gálico y Trolox aplicando el método antioxidante de DPPH•, se determinó la concentración de extractos miceliales de distintas especies de hongos comestibles.

TABLA 1.
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CEPAS, *pleurotus* y *C. Cibarius* POR TROLOX [μM].

Muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	\bar{X}	$\sigma(\pm)$
CC M1	23.035	22.772	19.449	21.752	1.999
CC M2	22.508	27.202	25.250	24.987	2.358
CC M3	18.553	18.605	19.660	18.939	0.625
PO M1	22.455	20.504	20.346	21.102	1.175
PO M2	13.912	13.384	15.230	14.175	0.951
PO M2	18.711	18.658	19.344	18.904	0.382
PO M3	22.244	23.141	24.037	23.141	0.897

Nota: PO=*Pleurotus ostreatus*, CC=*Cantharellus cibarius*, M=Muestra 1, 2 y 3.

TABLA 2.
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CEPAS, *pleurotus* y *C. Cibarius* POR ÁCIDO GÁLICO [μM].

Muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	\bar{X}	$\sigma(\pm)$
CC M1	13.062	12.916	11.079	12.352	1.105
CC M2	12.770	15.365	14.286	14.140	1.304
CC M3	10.584	10.613	11.196	10.798	0.345
PO M1	12.741	11.662	11.575	11.993	0.650
PO M2	8.0189	7.727	8.747	8.164	0.525
PO M2	10.671	10.642	11.021	10.778	0.211
PO M3	12.625	13.120	13.616	13.120	0.496

TABLA 3.
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CEPAS, *pleurotus* y *C. Cibarius* POR ÁCIDO CAFEICO [μM].

Muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	\bar{X}	$\sigma(\pm)$
CC M1	12.686	12.544	10.753	11.994	1.077
CC M2	12.401	14.931	13.880	13.737	1.271
CC M3	10.269	10.298	10.866	10.478	0.337
PO M1	12.373	11.321	11.236	11.643	0.633
PO M2	7.768	7.484	8.479	7.910	0.513
PO M2	10.355	10.326	10.696	10.459	0.206
PO M3	12.259	12.742	13.226	12.742	0.484

Los datos mostrados en las tablas de actividad antioxidante usando las curvas de calibración podemos observar en el caso de Trolox es donde se obtuvo mayor sensibilidad, y permite determinar mejor la actividad antioxidante presente en los extractos miceliales etanólicos obtenidos a las diferentes condiciones de cultivo, aun cuando la correlación de la curva de calibración es la más baja de las tres.

D. Determinación de concentraciones de extractos etanólicos de distintas cepas de hongos comestibles por radical ABTS•+.

En las Tablas 4, 5 y 6 se indica el porcentaje de inhibición antioxidante, posteriormente con base a las curvas de calibración obtenidas de Ácido Cafeico, Ácido Gálico y Trolox aplicando el método antioxidante de ABTS•+, se determinó la concentración de extractos miceliales de distintas especies de hongos comestibles todas estas se realizaron por triplicado.

Al igual que el método antioxidante anterior, las curvas de Trolox es donde se obtuvieron mayor sensibilidad y estabilidad en las concentraciones de los extractos etanólicos miceliales.

TABLA 4.
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CEPAS, *pleurotus* y *C. Cibarius* POR TROLOX [μM].

Muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	\bar{X}	$\sigma(\pm)$
CC M1	218.273	220.921	224.451	221.215	3.099
CC M2	165.319	160.906	165.760	163.995	2.684
CC M3	103.098	111.482	92.948	102.509	9.281
PO M1	91.183	81.033	91.183	87.800	5.860
PO M2	98.685	94.713	79.709	91.036	10.008
PO M2	89.859	90.742	86.770	89.124	2.086
PO M3	92.948	101.774	102.656	99.126	5.368

TABLA 5.
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CEPAS, *pleurotus* y *C. Cibarius* POR ÁCIDO GÁLICO [μM].

Muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	\bar{X}	$\sigma(\pm)$
CC M1	11.460	11.610	11.810	11.627	0.176
CC M2	8.461	8.211	8.486	8.386	0.152
CC M3	4.937	5.412	4.3624	4.904	0.526
PO M1	4.262	3.687	4.262	4.070	0.332
PO M2	4.687	4.462	3.612	4.254	0.567
PO M2	4.187	4.237	4.012	4.145	0.118
PO M3	4.362	4.862	4.912	4.712	0.304

TABLA 6.
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CEPAS, *pleurotus* y *C. Cibarius* POR ÁCIDO CAFEICO [μM].

Muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	\bar{X}	$\sigma(\pm)$
CC M1	147.919	149.825	152.366	150.037	2.231
CC M2	109.798	106.621	110.115	108.845	1.932
CC M3	65.006	71.042	57.699	64.582	6.682
PO M1	56.429	49.122	56.429	53.993	4.219
PO M2	61.829	58.970	48.169	56.323	7.205
PO M2	55.476	56.111	53.252	54.946	1.501
PO M3	57.699	64.053	64.688	62.147	3.865

IV. CONCLUSIONES

Se logró observar que, de las tres curvas utilizadas con los diferentes reactivos de Ácido Cafeico, Ácido Gálico y Trolox, se calculó el porcentaje de inhibición de cada uno de modo que se pudiera linealizar de manera preliminar, tanto por el método DPPH• como ABTS•+ se encontró que la actividad antioxidante en el caso de Trolox es donde se obtuvo mayor sensibilidad en las concentraciones obtenidas en unidades micro molar.

Podemos mencionar que de las tres curvas el que más ofrece una mayor concentración de extractos de la muestra determinada (en este caso muestra extracto etanólico de distintos hongos), es Trolox, un precursor de la vitamina E y utilizado en diferentes ensayos antioxidantes, por otro lado, es muy recomendable que cuando se desee leer alguna muestra espectrofotométrica, es muy importante realizar un barrido para conocer longitud de onda exacta de donde encuentres compuestos de interés.

Los resultados obtenidos muestran una actividad antioxidante de *C. cibarius*, *P. ostreatus* CL y *P. ostreatus* p83 con los tres compuestos de referencia tanto por el método DPPH• como ABTS•+ son comparables con los valores reportados por González-Morales et al. en [15].

También podemos observar que se pueden utilizar cualquiera de las dos metodologías con los tres reactivos de referencia para determinar la actividad antioxidante en los extractos, lo único que varía es la sensibilidad en las concentraciones.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Cuerpo Académico de Fermentaciones. Universidad Politécnica de Tlaxcala. Así como la participación de profesores pertenecientes al cuerpo académico del programa educativo de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Tlaxcala.

REFERENCIAS

- [1]. García, A., & Sánchez, J. A. (2009). *Setas de la Península Ibérica y de Europa*. Everest.
- [2]. Hawksworth, DL (2001). La magnitud de la diversidad de hongos: revisión de la estimación de 1,5 millones de especies. *Investigaciones micológicas*, 105 (12), 1422-1432
- [3]. Chang, S.T., Wasser, S.P. (2012). The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal Medical Mushrooms*, 14(2), 95-134.
- [4]. Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 258–274.
- [5]. Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V. y Pizzoferrato L. (1999). Nutrients in edible mushroom: An inter-species comparative study. *Food Chem*, 65, 477–482.
- [6]. Knowledge Sourcing Intelligence (2017). Global edible mushrooms market – Industry trends, opportunities and forecasts to 2023.
- [7]. Madigan T. y Martinko M. (2009). Brock. *Biología de los microorganismos* (12a ed.). PEARSON Education. pp 601.
- [8]. Mattos S. J., Ford L., Alberti F., Banks M., Bailey M., y Foster D. (2016). The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. *Studies in Mycology*, 85(Litten 1975), 125–157. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.002>
- [9]. Barros L., Baptista P., Correia M., Casal S., Oliveira B., y Ferreira R. (2007). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chem*, 105, 140–145.
- [10]. Barros L, Venturini BA., Baptista P., Estevinho LM., and Ferreira ICFR. (2008) Chemical Composition and Biological Properties of Portuguese Wild Mushroom: A comprehensive Study. *J Agric. Food Chem.*; 56: 3856-62.
- [11]. Cardoso C., Fernandes A., Oliveira P., Calheta C., Barros L., Martins A., & Ferreira R. (2017). Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of: *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. *Food and Function*, 8(6), 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/c7fo00515f>
- [12]. Lindequist U., Niedermeyer J. y Jülich D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *ECAM*, 2, 285– 299.
- [13]. Polak J, Bartoszek M, Chorązewski M. Antioxidant capacity: Experimental determination by EPR spectroscopy and mathematical modeling. *J. Agric. Food Chem.* 2015;63: 6319–6324. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01478.
- [14]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [15]. González-Morales, A., Ribas-Aparicio, R.M. y Burrola-Aguilar, C. 2021. Actividad antioxidante de hongos silvestres consumidos tradicionalmente en el centro de México. *Scientia Fungorum*. Vol. 52:e1410. DOI: 10.33885/sf.2021.52.1410.
- [16]. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [17]. Badarinath, A., K.M. Rao, C.M.S. Chetty, S. Ramkanth, T. Rajan, K.A. Gnanaprakash, 2010. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of Pharm Tech Research* 2: 1276-1285.
- [18]. Chen T, Liou S, Wu H, Tsai F, Tsay C, Huang C, Chang Y. New analytical method for investigating the antioxidant power of food extracts on the basis of their electron-donating ability: Comparison to the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58(15):8477-8480. DOI: 10.1021/jf9044292.
- [19]. Islas Santillán, M. A., Castañeda Ovando, A., Álvarez Delgadillo, A., Valenzuela Garza, R., Romero Bautista, L., & Torres Valencia, J. M. (2017). Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. *Scientia Fungorum*, 9.
- [20]. Munoz J, García F, Varon R, Tudela J, García F, Rodríguez J. Quantification of the antioxidant capacity of different molecules and their kinetic antioxidant efficiencies. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58; 2062–2070. DOI: 10.1021/jf9042024.
- [21]. Salazar López, J. M., Martínez Saldaña, M. C., Reynoso Camacho, R., Chávez Morales, R., Sandoval Cardoso, M. L., & Guevara Lara, F. (2017). Capacidad antioxidante y caracterización fitoquímica de extractos etanólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) crudo y cocido. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 48, No. 3, 37-47 pp.
- [22]. Mau, J.L., S.Y. Tsai, Y.H. Tseng, S.J. Huang, 2005a. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 93: 641-649.
- [23]. Xu W, Li B, Ching E, Chen L, Huang J, Man A, Keung P. Water extract from *Pleurotus pulmonarius* with antioxidant activity exerts in vivo chemoprophylaxis and chemosensitization for liver cancer. *Nutr. Cancer* 2014; 66(6); 989–998. DOI: 10.1080/01635581.2014.936950.