



---

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Obtención de la cepa de *Auricularia americana* y su  
evaluación en la producción de moléculas  
antimicrobianas, antioxidantes y  $\beta$ -glucanos.

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G A**  
**P R E S E N T A:**

**Saraí Román Mata.**

**DIRECTOR**

**Dra. Ibeth Rodríguez Gutiérrez**

**CODIRECTOR**

**Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal**

**CUERNAVACA, MORELOS A 2023**

## AGRADEZCO A

*La Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal por haberme permitido realizar la tesis de licenciatura en su laboratorio, también por asesorarme con la tesis.*

*La Dra. Ibeth Rodríguez Gutiérrez por aceptar ser mi directora de tesis y asesorarme.*

*A todos mis profesores de la facultad de Biología por ayudarme a comprender la Biología.*

*A todos mis compañeros de laboratorio por darme el apoyo moral.*

*A mi familia gracias a Dios por haberme dado todo el apoyo económico y moral.*

## *DEDICATORIA*

*A Dios por haberme permitido cumplir una meta y darme salud y a mi familia que me apoyo en todo momento.*

*Principalmente a mi madre Elida Mata Mancilla por guiarme por un buen camino y darme todo el apoyo económico y moral, gracias por todo el amor que nunca me faltó en el transcurso de la carrera.*

# ÍNDICE

RESUMEN .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. ANTECEDENTES .....	11
2.1 Distribución.....	11
2.2 Clasificación Morfológica y Molecular .....	12
2.3 Importancia en México .....	12
2.4 Taxonomía de <i>Auricularia americana</i> .....	14
2.5 Metabolitos generales .....	15
2.5.1 Metabolitos secundarios en los hongos basidiomicetos.....	16
2.5.2 Polisacáridos .....	17
2.5.3 Antioxidantes .....	18
2.5.4 Actividad antiinflamatoria .....	20
2.5.5 Actividad anticancerígena.....	21
2.5.6 Efecto antimicrobiano y antiviral.....	21
2.5.7 Compuestos polifenólicos .....	21
2.5.8 Proteínas.....	22
2.4.9 Melanina .....	22
2.5.10 Adenosina .....	23
2.5.11 Valor nutricional de <i>A. auricula-judae</i> .....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPOTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
7. METODOLOGÍA.....	25

7.1 Aislamiento de <i>Auricularia americana</i> .....	25
7.2 Cultivo en medios líquidos .....	26
7.3 Filtración de la biomasa y obtención de los sobrenadantes .....	27
7.4 Actividad antimicrobiana.....	27
7.5 Actividad antimicrobiana en difusión en placa.....	28
7.6 Técnica $\beta$ -1,3-1,6-Glucanos.....	28
7.7 Antioxidante.....	29
7.8 Determinación de fenoles totales .....	30
7.9 Análisis estadísticos .....	30
8. RESULTADOS.....	30
8.1 Obtención de la cepa.....	31
8.2 Velocidad de crecimiento .....	31
8.3 Biomasa del medio líquido .....	32
8.4 Contenido total de fenoles presentes en los extractos crudos de <i>Auricularia americana</i> ..	33
8.5 Actividad antioxidante presente en los extractos crudos de <i>Auricularia americana</i> .....	36
8.5.1 Inhibición del radical ABTS .....	36
8.5.2 Inhibición del radical DPPH .....	37
8.5.3 Actividad antimicrobiana presente en los extractos crudos de <i>Auricularia americana</i> .....	38
8.5.4 $\beta$ -glucanos presentes en los extractos crudos de <i>Auricularia americana</i> .....	40
9. DISCUSIÓN. ....	40
10. CONCLUSIÓN.....	42
11. PERSPECTIVAS .....	43
13. BIBLIOGRAFIA .....	43
ANEXOS .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de *Auricularia*.

Figura 2. Especies de *Auricularia* recolectadas alrededor de la UAEM.

Figura 3. A) Basidioma de *Auricularia americana* en fresco; B) Corte donde se observa que no hay médula presente; c) Basidiospora alantoide (Fotos propias).

Figura 4. Aislamiento de *Auricularia americana*.

Figura 5. Crecimiento de *Auricularia americana* en M17.

Figura 6. Crecimiento del micelio en los medios líquidos, expresado en biomasa en peso seco.

Figura 7. Curva estándar de pirogalol.

Figura 8. Concentración de fenoles totales.

Figura 9. Porcentaje de inhibición del radical ABTS de extractos crudos de *Auricularia americana* en M17 y EM.

Figura 10. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de extractos crudos de *Auricularia americana* en M17 y EM.

Figura 11. Cinética de inhibición de crecimiento con sobrenadantes de *A. americana* en M17.

Figura 12. Cinética de inhibición de crecimiento con sobrenadantes de *A. americana* en EM.

Figura 13. Concentración de  $\beta$ -glucanos a lo largo de ocho tomas de muestras de *Auricularia americana* M17 y EM.

## **ÍNDICE DE TABLAS.**

Tabla 1. Compuestos activos de diversas especies de *Auricularia*.

Tabla 2. Descripción de las cepas de *Auricularia americana*.

Tabla 3. Concentración de fenoles totales en los extractos crudos de *Auricularia americana* en el medio M17.

Tabla 4. Concentración de fenoles totales en los extractos crudos de *Auricularia americana* en el medio EM.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del radical ABTS.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del DPPH.

## **ABREVIATURAS**

**ARNm:** Ácido Ribonucleico Mensajero

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADP:** Adenosín Difosfato

**PPAR:** Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales

**ABTS:** Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico

**PDA:** Agar de Dextrosa de Papa

**EMA:** Agar extracto de malta

**HIT:** Harina de Trigo Integral

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**NDV:** Enfermedad de Newcastle

**TPC:** Contenido Fenólico Total

**TFC:** Contenido Total de Flavonoides

**FRAP:** Método del Poder Antioxidante/reductor Férrico

**TEAC:** Método de Capacidad Antioxidante equivalente Trolox

**NDV:** Virus de la Enfermedad de Newcastle

**M17:** Medio 17



## RESUMEN

La diversidad del género *Auricularia* presente en México es de ocho especies: *A. americana*, *A. angiospermarum*, *A. cornea*, *A. nigricans*, *A. fuscosuccinea*, *A. brasiliana*, *A. tremellosa* y *A. scisa*, su distribución es amplia y algunas especies presentan una afinidad a bosques templados o selvas. Una de las especies mejor estudiadas en cuanto a su composición nutrimental y biomoléculas es *A. auricula-judae* en peso seco es de 8-10% de proteína, 0.8-1.2% de grasa, 84-87% de carbohidratos, 9-14% de fibra y 4-7% de cenizas, su contenido de agua es de aproximadamente del 90%. El cuerpo fructífero de *A. auricula-judae* es rico en heteropolisacáridos de D-glucosa con varias cadenas laterales de residuos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos de glucosa, manosa, xilosa y ácido glucurónico. No obstante en México esta especie no está presente.

El género cuenta con propiedades medicinales, como: antibacteriana, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral, cardioprotectora, hipoglicémica, anticoagulante, antiplaquetaria y efectos anticancerígenos. El objetivo del presente trabajo fue obtener la cepa pura en sólido de *Auricularia americana*, en los medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Harina de Trigo Integral (HIT), Agar Extracto de Malta (EMA) y Agar de Medio 17 para determinar su velocidad de crecimiento y producción de biomasa. Con estos resultados se seleccionaron los mejores medios para obtener extractos del cultivo líquido y determinar la actividad antimicrobiana, antioxidantes y  $\beta$ -glucanos.

Los resultados muestran que los medios M17 y EM son los mejores con 1.54 y 1.91 cm/día en velocidad de crecimiento, igualmente para producción de biomasa EM es mejor que M17, con valores de 2.9 g/l en comparación con 0.5 g/L respectivamente, ambos se seleccionaron para continuar los estudios en cultivo líquido. El extracto del día 14 del medio M17 tuvo un efecto bactericida de 6 horas para *Escherichia coli* y el del día 12 de 7 horas para *Staphylococcus aureus*. El extracto del día 16 del medio M17 tuvo un efecto bactericida de 9 horas para *Escherichia coli* y en el EM del día 14 de 7 horas para *Staphylococcus aureus*. Las mayores concentraciones de fenoles totales se obtuvieron en el medio líquido M17 al día 17 con 179.063  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y en EM al día 2 con 169.86  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Los valores más altos de actividad antioxidante en los extractos por el radical DPPH se presentaron en el día 14 en medio M17 y EM al día 8 con 27.5 y 26.3% respectivamente. Mediante inhibición del radical ABTS los valores más altos de actividad antioxidante se registraron al día 16 con el 26.3% y 15.6%

respectivamente. Los  $\beta$ -glucanos registrados en los extractos crudos fueron mayores en el medio líquido M17 con 826,16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mientras que en EM fue de 788.97  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## 1. INTRODUCCIÓN

Existe un inmenso grupo de microorganismos muy versátiles, con diferentes morfologías, fisiologías y ciclos de vida. Los hongos han sido parte de la cultura humana, siendo una excelente alternativa para satisfacer las necesidades nutricionales de la población principalmente en los países en desarrollo; se sabe que los hongos son uno de los grupos de organismos con mayor diversidad, se calcula que en el mundo debe de haber por lo menos un millón y medio de especies (Sierra et al., 2012). Desde la antigüedad los hongos son reconocidos como alimento importante y su uso aumenta día a día debido a su importante papel en la salud humana, la nutrición y las enfermedades. Moore y Chiu, 2001, registraron que los hongos son alimentos ideales porque tienen un contenido bastante alto de proteínas, normalmente entre un 20-30% de materia seca como proteína cruda, que contiene todos los aminoácidos esenciales.

La biomasa fúngica también es una fuente de fibra dietética y está prácticamente libre de colesterol. Yadav & Negi, 2021, reportaron que los hongos son una buena fuente de vitaminas y minerales; demostrando que muchos producen una serie de metabolitos de intenso interés para las industrias nutraceútica, farmacéutica y alimentaria. La mayoría de las especies, si no es que todas, contienen polisacáridos biológicamente activos. Los cuerpos fructíferos, los micelios y el caldo sumergido son fuentes de los compuestos bioactivos. Además, los extractos de hongos han llamado mucho la atención por sus propiedades inmunológicas y anticancerígenas. También ofrecen otras propiedades terapéuticas potencialmente importantes, como antioxidantes, actividades antihipertensivas, reductoras del colesterol, protección hepática, antifibróticas, antiinflamatorias, antidiabéticas, antivirales y antimicrobianas (Hassan & Medany, 2012). En los últimos años, también se han descrito estas actividades medicinales y nutricionales para los hongos del género *Auricularia*. Estos peculiares hongos con cuerpos fructíferos en forma de oreja y de color café oscuro, rojizo o marrones principalmente, crecen en la madera de árboles y arbustos caducifolios. Estos han sido muy valorados en la cocina asiática y en la medicina natural durante siglos. Entre ellos, *A. auricula-judae*, *A. nigricans* y

*A. fuscosuccinea* se cultivan comercialmente en los países asiáticos porque tanto los chinos y los japoneses los consumen diariamente en sus platillos tradicionales, se encuentra en platos calientes, sopas, ensaladas, guisos cárnicos y verduras, por ejemplo el Chao Muer en China y en Japón se le conoce como kikurage y se encuentra en platos con caldos, sopas con arroz o pastas como soba, udon, ramen, noodels, etc., y con cárnicos puerco, aves, mariscos, huevo crudo y salsa de soja (Sekara et al., 2015). Además, en Japón existen elixires a base de kikurage con fines medicinales.

## **2. ANTECEDENTES**

Con el uso de los hongos como fuente alimentaria y medicinal, la producción mundial de hongos se ha multiplicado por más de 30 veces desde 1978. El incremento en la producción mundial de hongos también coincide con un aumento simultáneo (1-7 veces), en la población humana, presumiblemente debido a la importancia de los hongos como fuente de alimento. Hay dos grupos principales de hongos comestibles macromicetos; a) Ascomicetos, que incluyen Discomycetes (hongos de la Cota) y los famosos Tuberales o trufas, y b) Basidiomycetes, que incluyen Phragmobasidiomycetidae que abarcan tres órdenes: *Auriculariales*, *Septobasidiales* y *Tremellales*. Entre estos hongos, el orden *Auriculariales* (anteriormente conocido como "hongos de gelatina") contiene una serie de especies que tienen valor como hongos comestibles y medicinales (Sierra et al., 2012).

### **2.1 Distribución**

El género *Auricularia* tiene una distribución mundial y es muy importante debido a su comestibilidad y propiedades medicinales. Se llevaron a cabo exámenes morfológicos y análisis filogenéticos multigénicos de 277 muestras de 35 países de Asia, Europa, América del Norte y del Sur, África y Oceanía. Los análisis filogenéticos se basaron en secuencias ITS, nLSU, rpb1 y rpb2 utilizando métodos de análisis de Máxima Verosimilitud y de Inferencia Bayesiana (Wu et al., 2021).

## 2.2 Clasificación Morfológica y Molecular

De acuerdo con los caracteres morfológicos y moleculares se registra una diversidad de 37 especies de *Auricularia*. Diez nuevas especies, *A. camposii* y *A. novozealandica* en el complejo *A. cornea*, *A. australiana*, *A. conferta*, *A. lateralis*, *A. pilosa* y *A. sinodelicata* en el complejo *A. delicata*, *A. africana*, *A. srilankensis* y *A. submesenterica* en el complejo *A. mesenterica*. Las dos especies conocidas *A. pusio* y *A. tremellosa*, respectivamente, pertenecientes al complejo *A. mesenterica* y al complejo *A. delicata*, mientras que se valida *A. angiospermarum*, perteneciente al complejo *A. auricula-judae* (Wu et al., 2021).

La especie estudiada en la presente investigación es *Auricularia americana*, crece en la madera y producen un cuerpo fructífero en forma de oreja o de copa invertida que es de color marrón rojizo, canela, marrón amarillo, marrón oliva o marrón negruzco. El contexto es delgado, gomoso a flácido-gelatinoso. La superficie estéril superior convexa tiene una cubierta densa y sedosa o es minúsculamente peluda. La superficie fértil inferior cóncava es lisa.

Ambas superficies suelen tener nervaduras y venas irregulares. La especie considerada aquí corresponden al complejo filogenético *Auricularia auricula-judae*. Los miembros de este grupo incluyen al menos dos miembros norteamericanos, *Auricularia americana* (que también crece en Asia) y *Auricularia angiospermarum*.

Estas dos especies están separadas por estudios moleculares y de hábitat: el primero crece en madera de coníferas como pino y cedro, y el segundo en madera dura como encino, haya y huizache. El grupo también incluye la especie europea mal nombrada *Auricularia auricula-judae*, común en Europa central (Gibson, 2022).

## 2.3 Importancia en México

El género *Auricularia* está distribuido prácticamente en todo el país, sólo los estados de Sonora, Nuevo León, Aguascalientes y Guanajuato no cuentan con un registro, esto se puede deber a diversas causas como son falta de colectas, ausencia de las especies en estos ambientes o bien falta de publicaciones. La diversidad de especies de *Auricularia* en México es sobresaliente, debido a que se registran 8 de las 10 especies citadas para América. En gran medida esta diversidad es el resultado de la historia biogeográfica del país, pues al igual que en muchos otros grupos, en México habitan especies de *Auricularia* características tanto del Neártico como del Neotrópico, así como cosmopolitas.

La mayor riqueza de especies de *Auricularia* se encuentra en la zona centro-sur de México, que es donde están las zonas tropicales y subtropicales en el país (Fig. 1) (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2022). El mapa de la distribución de las especies en México no es un reflejo completo de la realidad de la riqueza de especies por estado de la república, debido a que esto está asociado a la intensidad de muestreo diferencial y a la escasez de taxónomos y colecciones en algunos estados. Sin embargo, la distribución de *Auricularia* (Fig. 1) se muestra sombreada en gris para los estados con al menos una especie registrada.

La importancia del consumo de especies de *Auricularia* radica en la composición nutricional que poseen en proteínas, grasa, carbohidratos, fibra, vitaminas ( $\beta$ -caroteno, provitamina D, tiamina, riboflavina y niacina) y minerales (calcio, fósforo, hierro, sodio, potasio, silicio, aluminio, azufre y cloro). Su composición es muy rica en diversos nutrimentos, siendo una fuente de alimento que se encuentra disponible a lo largo de todo el año, para los pobladores de diferentes localidades del país (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2022).



Figura 1. Distribución de *Auricularia* se representan sombreados en gris los estados con al menos una especie registrada. Los triángulos en color representan a cada una de las especies reconocidas de *Auricularia* y se observa *A. americana* marcada de color azul cielo (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2022).

Los compuestos bioactivos de las especies de *Auricularia*, que incluyen principalmente polisacáridos, son conocidos por sus propiedades antitumorales, antioxidantes, anticoagulantes

e inmunomoduladoras. El conocimiento de los compuestos bioactivos son cruciales para mejorar nuestra comprensión de su farmacología y podría conducir al desarrollo de nuevos medicamentos terapéuticos (Ar et al., 2019).

## 2.4 Taxonomía de *Auricularia americana*

El presente trabajo se enfoca en la especie *Auricularia americana*, los ejemplares mexicanos tienen las siguientes características (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2022):

Macromorfología: Basidioma de hasta 90 mm de diámetro, por 1–7 mm de grosor, solitario a cespitoso, sésil a subestipitado, convexo a auriculado, algunas veces con el margen lobado, redondo a subredondo, marrón, marrón claro a oscuro a marrón vináceo, himenóforo liso a ligeramente sulcado, abhimenio velutinoso a viloso, con pelos blanquecinos. Micromorfología: Médula ausente, zona pilosa de 70–120  $\mu\text{m}$  de grosor, zona compacta de 40–90  $\mu\text{m}$  de grosor, zona subcompacta superior de 35–75  $\mu\text{m}$  de grosor, zona laxa intermedia de 350–700  $\mu\text{m}$  de grosor, zona subcompacta inferior de 100–350  $\mu\text{m}$  de grosor, himenio de 65–120  $\mu\text{m}$  de grosor, pelos del abhimenio de 60–180  $\times$  4.5–6  $\mu\text{m}$ , de pared gruesa, hifas con fíbulas, basidios de 50–78  $\times$  4–6.5  $\mu\text{m}$ , basidiosporas hialinas, alantoides, de 13–16  $\times$  4.5–6  $\mu\text{m}$ ,  $Q = 2.4\text{--}3.2$ . Se encuentra distribuida la especie en bosques de *Abies*, *Cupressus*, *Juniperus* y *Pinus*, así como en mesófilo de montaña, de los 2100 a los 3900 m s.n.m. En Baja California Norte, Ciudad de México, Chihuahua, Durango, Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Querétaro y Tlaxcala.

Las características distintivas de *A. americana* son su himenóforo liso con una capa cortical velutinoso a pubescente y basidiosporas de 13–16  $\mu\text{m}$  de longitud. En México se ha citado previamente como *A. auricula-judae*; sin embargo, esta especie sólo se distribuye en Europa, presenta basidiosporas ligeramente más grandes (15–22  $\times$  5–7  $\mu\text{m}$ ) y crece sobre troncos de árboles deciduos (Wu et al., 2015). Otra especie con la que puede confundirse es *A. angiospermarum*, pero esta es exclusiva de angiospermas (Wu et al., 2015), mientras que *A. americana* sólo crece en madera de gimnospermas; por lo tanto, el tipo de vegetación y substrato son la clave para la distinción de estas especies.

La clasificación taxonómica es la siguiente de acuerdo con Index Fungorum (2022):

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Agaricomycotina

Orden: Auriculariales

Familia: Auriculariaceae

Género: *Auricularia*

Especie: *A. americana* Parmasto & I. Parmasto ex Audet, Boulet & Sirart

## 2.5 Metabolitos generales

Muchos autores vinculan las propiedades antitumorales y antibacterianas de los hongos comestibles con sus propiedades antioxidantes, debido a que estos son capaces de producir una vasta gama de compuestos con estas características que presentan una amplia variedad de estructuras y mecanismos de acción, donde la compleja variedad de enzimas y metabolitos secundarios producidos por los hongos juegan un importante papel en el combate de las células tumorales y los microorganismos patógenos. Algunos ejemplos de los compuestos presentes en los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles y que tienen potencial terapéutico se enlistan a continuación (López-Pino, 2016):

- $\beta$ -glucanos

Estos compuestos son polisacáridos no celulósicos constituidos por unidades de glucosa unidas por enlace  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-6, aislados principalmente de la pared celular y los cuerpos fructíferos (constituyendo cerca del 50% de estos). Se ha demostrado que poseen actividades inmunoestimuladoras, anticancerígenas, hipocolesterolémicas, hipoglucémicas, antiinflamatorias y analgésicas.

- Policétidos

Son una familia de compuestos con una estructura muy diversa formados por la polimerización de acetilo ( $-\text{COCH}_3$ ) y propionilo ( $\text{C}_3\text{OH}_5$ ), donde sobresalen las estatinas como lovastatina, pravastatina y simvastatina con efecto hipocolesterolémico al inhibir la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzimaA reductasa, primera enzima involucrada en la biosíntesis de colesterol. Se ha observado que los policétidos de manera general tienen acción antibiótica, antifúngica y citostática.

- Terpenoides

Están formados por unidades de isopreno unidas cabeza a cola, uno de los más importantes es el ergosterol que se caracteriza por sus propiedades anticancerígena, antimicrobiana, antiinflamatoria, antifúngica y antitumoral.

- Ácidos orgánicos

La presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido oleico (omega-9) y el linoleico, (omega-3, omega-6) constituyen una característica nutracéutica favorable, puesto que son esenciales en una dieta sana y brindan protección frente a enfermedades cardiovasculares y la arterioesclerosis producida por el colesterol (LDL). Otros ácidos orgánicos de interés presentes en los extractos obtenidos a partir del micelio y los cuerpos fructíferos son: el ácido oxálico, cítrico, málico, quínico y fumárico; siendo los más abundantes el málico y el quínico, constituyendo del 35 al 84% de los ácidos no aromáticos, seguidos frecuentemente por el ácido cítrico de un 9-10%.

### **2.5.1 Metabolitos secundarios en los hongos basidiomicetos**

Dentro de la amplia gama de metabolitos secundarios que los hongos comestibles producen cabe destacar algunos debido a su importancia desde el punto de vista nutritivo y médico; estos compuestos pueden ser obtenidos en forma de soluciones acuosas o extractos alcohólicos (López-Pino, 2016). Dentro de este grupo se encuentran los siguientes:

- Antioxidantes

Los compuestos encontrados mayoritariamente en los cuerpos fructíferos y que poseen actividad antioxidante son de origen fenólico, como los flavonoides (compuestos con estructura c6-c3-c6) y taninos (formados por ácidos fenólicos como el gálico y azúcares simples), los cuales son capaces de eliminar radicales libres, activar enzimas y tienen propiedades antimicrobianas, puesto que sus mecanismos de acción interfieren en la síntesis de la pared celular, lisis de las membranas, inhibición de la síntesis proteica y la formación de biopelículas.

- Antimicrobianos

Existen numerosos estudios que demuestran las propiedades antibacteriana y antifúngica de los extractos provenientes de los hongos comestibles. Tanto los extractos acuosos como en base alcohólica han demostrado ser altamente eficaces contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y



*Salmonella typhi*, entre otras y contra Gram positivas como es el caso de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. Esta actividad antimicrobiana puede deberse a la presencia de un grupo de sustancias de carácter heterogéneo como glucósidos, taninos, saponinas, flavonoides, carbohidratos, proteínas y alcaloides, los que están en grados variables según la especie y el solvente empleado para la extracción.

En términos de valor medicinal, el género de *Auricularia* es un buen tónico estomacal que regula los flujos de energía vital. Los chinos lo usan para dolores reumáticos en las piernas y el lumbago, para la debilidad después del parto, calambres y entumecimiento, para dolores y lesiones de heridas, obstrucción en arterias y venas, ayuda a eliminar el dolor muscular en extremidades llamada tetania. Además, los chinos y los europeos lo utilizan para tratar la disentería maligna y la enteritis, para la menorragia con leucorrea, para las hemorroides y el sangrado uterino, para los trastornos gástricos que causan náuseas y flema excesiva (Odamtten et al., 2022).

### **2.5.2 Polisacáridos**

Cabe mencionar que *Auricularia americana* es una especie que sale del complejo de *A. auricula-judae* por lo cual los estudios que sirven como sosten al presente trabajo son sobre la especie antes mencionada.

Los polisacáridos presentes en *A. auricula-judae* lo califican para ser clasificado adecuadamente como un alimento funcional. Estos ingredientes funcionales son muy beneficiosos para la salud humana. También contiene altos niveles de fibras insolubles con bioactividades variadas. Esta especie contiene varios compuestos fenólicos, incluyendo los flavonoides epicatequina y catequina, y también se sabe que exhibe propiedades antioxidantes para prevenir el daño oxidativo inducido por radicales libres, equilibrar los niveles de glucosa y lípidos en sangre para aliviar la diabetes, la hiperlipidemia, la obesidad y estimula los macrófagos y las citocinas inflamatorias para prevenir la inflamación, exhibir propiedades anticancerígenas al estimular la apoptosis celular y prevenir la disbiosis microbiana intestinal estimulando la microbiota saludable (Odamtten et al., 2022).

Los principales componentes azucarados del basidiocarpio son la manosa, la galactosa y la glucosa y también contiene polisacáridos cicatrizantes de heridas. Por eso es bueno saber que este hongo tiene una función medicinal como nutricional. En la Tabla 1, se muestra la

bioactividad de los compuestos presentes en algunas especies de *Auricularia* (Ortiz et al., 2016).

Tabla 1. Compuestos activos de diversas especies de *Auricularia* (Ortiz et al., 2016).

Bioactividad	Especie	Compuesto bioactivo
Antibacterial	<i>A. auricularia-judae</i> <i>A. nigricans</i>	Melanina, eumelanina, feomelanina, compuestos solubles en etanol.
Antiviral	<i>A. auricula-judae</i>	Malondialdehído, ácido ascórbico, glutatión reducido, superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa.
Antioxidante	<i>A. auricula-judae</i> <i>A. nigricans</i> <i>A. fuscossuccinea</i>	Ácido ascórbico, tocoferoles, fenoles totales, polisacáridos, polisacáridos sulfatados y polisacáridos carboximetilados (los dos últimos tienen mayor actividad biológica).
Antiinflamatoria	<i>A. auricula-judae</i>	Glucuronoxilomananos, glucuronoxiloglucomananos, glucanos.
Inmunomoduladora	<i>A. auricula-judae</i> <i>A. nigricans</i>	Polisacáridos sulfatados, proteínas simples sin hidratos de carbono.
Antitumoral	<i>A. auricula-judae</i> <i>A. nigricans</i>	Diazane, heteroglicanos ácidos, betaglucanos (a 1, 3; a - 1,4; B 1 - 3), D - glucopiranosil (1,4).
Cardioprotectora	<i>A. auricula-judae</i>	Polisacáridos.
Hipolipemiente	<i>A. auricula-judae</i> <i>A. nigricans</i>	Polisacáridos solubles en agua.
Hipoglucémico	<i>A. auricula-judae</i>	Polisacáridos solubles en agua.
Anticoagulante, antiplaquetario	<i>A. auricula-judae</i>	Polisacáridos ácidos.

### 2.5.3 Antioxidantes

Entre los hongos, se deben tener en cuenta las diferencias relacionadas con las diferentes especies en su actividad antioxidante, las cuales muestran una actividad antioxidante de moderada a alta, mayor poder reductor, excelentes efectos de eliminación en los radicales

DPPH y efectos quelantes en los iones ferrosos, pero casi ningún efecto de eliminación en los radicales libres de hidroxilo en el género *Auricularia* (Mau et al., 2001). Son beneficiosos para el cuerpo humano a través del sistema de protección antioxidante contra el daño oxidativo (Şekara et al., 2015).

Se ha demostrado que los polisacáridos presentes en un extracto crudo de *A. auricula-judae* exhiben actividades antioxidantes significativas, que incluyen la eliminación de radicales libres, ensayos de poder reductor y ensayos de capacidad quelante del óxido de Hierro ( $Fe^{2+}$ ) (Cai et al., 2015). Un estudio anterior demostró que la formulación de pan de harina de polisacáridos obtenida de la oreja de judío presentó propiedades antioxidantes significativas, como lo demuestran las pruebas con el reactivo químico orgánico 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo o DPPH ABTS y actividades de eliminación de radicales por fenoles (Fan et al., 2007; Islam et al., 2016; Ng & See, 2019). Entre los métodos para determinar moléculas con importantes propiedades antioxidantes, se encuentran el contenido fenólico total (TPC), contenido total de flavonoides (TFC), el método del poder antioxidante/reductor férrico (FRAP) y el método de capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC).

En otro estudio se realizaron extractos metanólicos de cuerpos fructíferos (frescos, secados al horno y liofilizados) y micelio de *A. auricula-judae* fueron evaluados por sus capacidades antioxidantes con base en el ensayo DPPH y FRAP (Kho et al., 2009). También se ha analizado la actividad antioxidante de los extractos de etanol, el cloroformo y los extractos de agua caliente de la misma especie y se ha demostrado que presentan importantes propiedades antioxidantes (Gebreyohannes et al., 2019). Se ha demostrado que la capacidad antioxidante de los hongos de la oreja de judío protege contra el daño oxidativo y varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de colon y de mama (Panthong et al., 2016; Wong et al., 2020).

Está ampliamente aceptado que la obesidad se asocia con inflamación crónica de bajo grado y disbiosis intestinal (desequilibrio bacteriano en el intestino). Se ha demostrado que el tratamiento con extracto de agua caliente de *A. auricula-judae* reduce el peso corporal, la inflamación y la resistencia a la insulina en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Otro estudio mostró que el consumo a largo plazo de *A. auricula-judae* podría reducir la hiperlipidemia y sus complicaciones (Reza et al., 2015). Recientemente, Choi et al. (2019), demostraron que el tratamiento con extractos de *A. auricula-judae* suprimió significativamente la glucosa plasmática, el colesterol total, el peso de los órganos internos, la grasa del epidídimo,

la actividad de las enzimas hepáticas y las expresiones de ARNm de PPAR $\gamma$ , FABP4(aP2), CD36 y C/EBP $\gamma$ .

Un estudio anterior demostró que la administración de tres cepas de *A. auricula-judae* inhibía significativamente (4.43%) la diferenciación de adipocitos en células preadipocitos 3T3-L1. El mecanismo molecular subyacente parece depender del potencial de los polisacáridos para regular al alza de las expresiones de los genes de adiponectina y leptina en los tejidos adiposos y la baja de los biomarcadores inflamatorios a través de la activación de la vía de señalización de AMPK (Park et al., 2017). En este estudio, los autores ampliaron su investigación en un modelo *in vivo* con ratones ICR obesos inducidos por una dieta rica en grasas y observaron un efecto significativo de reducción del peso corporal en el grupo tratado en comparación con el grupo de control. Los resultados de otro estudio mostraron que el tratamiento con *A. auricula-judae* redujo significativamente la glucosa en sangre, el colesterol total, la AST y la ALT.

Además, los estudios *in vitro* también han confirmado que el tratamiento de adipocitos en ratón suprimió las expresiones de triglicéridos, glicerol, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y genes adipogénicos/lipogénicos (Reza et al., 2015). En conjunto, estos hallazgos demostraron que el tratamiento con *A. Auricula-judae* podría mejorar la obesidad a través de la regulación de factores transcripcionales adipogénicos/lipogénicos.

#### **2.5.4 Actividad antiinflamatoria**

La inflamación es un proceso crucial involucrado en el desarrollo de diversas enfermedades relacionadas con la síntesis de citocinas locales y óxido nítrico. Las citosinas, median directamente la regulación de la inflamación, inmunidad y hematopoyesis. Los macrófagos a menudo juegan un papel antiinflamatorio importante como mecanismo de defensa que limpia partículas microscópicas no deseadas, como bacterias, virus y células muertas que eventualmente disminuyen las respuestas inmunes. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que *A. auricula-judae* presenta una actividad antiinflamatoria potencial e inhibe la producción de citocinas proinflamatorias. El mecanismo protector de la especie y sus compuestos bioactivos estimulan las citocinas antiinflamatorias y evitan la respuesta inmunitaria, así como la formación de células cancerosas (Islam et al., 2021).

### **2.5.5 Actividad anticancerígena**

Se ha reportado que *A. auricula-judae* contiene cantidades ricas de  $\beta$ -glucanos, que defienden contra enfermedades inflamatorias, respaldan el sistema inmunitario y presentan una potencial actividad anticancerígena (Islam et al., 2021). Así mismo, se ha demostrado que los extractos acuoso y etanólico de esta misma especie expresan actividad antiproliferativa en las células de cáncer de mama. En la investigación del cáncer se han demostrado que el tratamiento con extracto *A. auricula-judae* conjugado con complejo de ácido fólico cisdiaminadichloroplatino (complejo AAP-FA-CDDP) exhibió una potente actividad anticancerígena en xenoinjertos tumorales con ratones desnudos y redujo la circulación a niveles de marcadores tumorales. Este complejo provocó la apoptosis a través de la regulación al alza de caspasa-3, Cyt-c y Bax6, y la regulación a la baja de Bcl-2, lo que indica una potente actividad anticancerígena del complejo a través de la estimulación de la señalización mitocondrial y las vías apoptóticas intrínsecas. Este complejo elevó significativamente las actividades de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GSHPx, y redujo los niveles de MDA en suero en comparación con los ratones tratados con cisplatino (Qiu et al., 2018).

### **2.5.6 Efecto antimicrobiano y antiviral**

Los polisacáridos crudos de extracto de *A. auricula-judae* se han utilizado previamente como agentes antimicrobianos en varios estudios *in vitro*. Se ha demostrado que estos polisacáridos exhiben una alta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*. La actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados de este hongo contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se investigó mediante el ensayo MTT. Sus resultados mostraron que los polisacáridos sulfatados inhibían la infectividad celular del NDV, lo que indicaba que la modificación con sulfato del polisacárido de este hongo puede mejorar la salud de los infectados con este virus (Islam et al., 2021).

### **2.5.7 Compuestos polifenólicos**

Las propiedades antioxidantes de los polifenoles suelen estar mediadas por el bloqueo de los efectos perjudiciales de los radicales libres, lo que da como resultado la fabricación normal de

proteínas estructurales de la piel. Con base en este escenario, los efectos de los polifenoles se han tornado altamente favorables para la industria cosmética al generar materias primas verdes que se aplican para la terapia y prevención del envejecimiento prematuro de la piel. También se reportó en el mismo trabajo, un polisacárido soluble en agua obtenido de *A. auricular judae* que inhibió el estrés oxidativo inducido en ratones envejecidos con D-galactosa. Del mismo modo estos polisacáridos muestran un efecto antifatiga contra el estrés oxidativo inducido por el ejercicio de natación exhaustiva en ratones. Este autor reportó, una combinación de estos polisacáridos para la fabricación de cremas/lociones antienvjecimiento y otros maquillajes relacionados con la piel en la industria cosmética. Se reportó que estos polisacáridos actúan a través de la inhibición de las enzimas funcionales responsables del envejecimiento de la piel, incluidas la elastasa, la tirosinasa, la hialuronidasa y la MMP-1. Además, ayudan a restablecer la elasticidad de la piel y a mejorar la producción de colágeno (Islam et al., 2021).

#### **2.5.8 Proteínas**

Después de los polisacáridos, las proteínas son los compuestos bioactivos más abundantes que se encuentran en *A. auricula-judae*. El análisis de composición proximal ha demostrado que contiene  $9.6 \pm 1.2$ g de proteínas. Otro estudio demostró que las proteínas inmunomoduladoras aisladas exhiben propiedades de inmunoestimulantes estables, incluida la tolerancia al calor, los ácidos, los álcalis, la congelación y la deshidratación (Changet al., 2009).

#### **2.4.9 Melanina**

Se ha descubierto que los estímulos ambientales alteran potencialmente la producción de melanina en *A. auricula-judae*, sin embargo, el mecanismo sobre la acumulación de esta sigue sin estar claro durante la congelación. Un análisis proteómico reciente sugirió que las proteínas que participan en el metabolismo de la glucosa, la tirosina, el ribosoma y la arginina pueden contribuir a los cambios de color en *A. auricula-judae* después de la congelación. Además, la fermentación microbiana de la melanina comestible también se puede optimizar para lograr un alto rendimiento de melanina natural. La melanina extraída de esta especie exhibe actividades antimicrobianas significativas, como lo demuestra la inhibición de biopelículas producidas por *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* (Islam et al., 2021). La melanina se aplica industrialmente como pigmento natural, antioxidante y agente antibacterial en los sectores

alimenticio, cosmetológico, farmacológico, entre otros. Así mismo, los polisacáridos de *A. auricula* han sido empleados por su actividad antioxidante como conservantes de enlatados, principalmente escabeche 43 y como suplementos de la harina de trigo para la elaboración de panes enriquecidos (Ortiz et al., 2016).

#### **2.5.10 Adenosina**

La adenosina es un nucleósido que está presente en las moléculas de ADN y ARN. Se ha descubierto que la adenosina de *A. auricula-judae* presenta un potente efecto inhibidor sobre la agregación de plaquetas en los animales, junto con una actividad antiplaquetaria potencial. En África Occidental, este hongo se utiliza en medicina popular para enfermedades como dolor de garganta y de ojos, ictericia, astringente, entre otras. En los restaurantes chinos, se utiliza para preparar platos calientes y sopa agria que también está disponible en Ghana. En la medicina folclórica ghanesa, se utiliza como tónico de la sangre (Odamtten et al., 2022).

#### **2.5.11 Valor nutricional de *A. auricula-judae***

El valor nutricional de 100 g del cuerpo fructífero seco de *A. auricula-judae* incluye 293 kcal, 9.4g de ceniza, 8.1g de proteína, 1.5g de grasa, 81g de hidrato de carbono, 6.9g de alcaloides de fibra cruda, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico. Manjunathan et al. (2011) indicaron que *A. nigricans* (=polytricha), recogido en el sur de la India era una muy buena fuente de proteína cruda (37%), fibra cruda (21.97%), ceniza (6.87%), calcio (607mg·g<sup>-1</sup> peso seco) y manganeso (136mg·kg<sup>-1</sup> peso seco). En *A. nigricans* cultivada de forma natural, 60.2% ácidos grasos en fracción insaturada, con una proporción de ácido linoleico: oleico de 1.08. *A. fuscusuccinea* contenía el alto nivel de grasa y fibra crudas, componentes dulces y nucleótidos, en comparación con las otras especies de *Auricularia* (*A. auricula-judae* y *A. polytrycha*). El contenido de proteínas en *A. auricula-judae* y *A. fuscusuccinea* fue significativamente más que en *A. nigricans* (=polytricha). Se determinó que *A. auricula-judae* (ácido glutámico), *A. polytricha* (lisina) y *fuscusuccinea* (alanina, ácido glutámico, serina y treonina) (Şekara et al., 2015).

Las especies de *Auricularia* tienen un contenido de fibra un 50% más alto que los otros hongos comestibles, por lo que se pueden utilizar como complemento alimenticio, junto con fibra. Kim et al. (2004) mostraron que dicha suplementación mejoró significativamente los síntomas

relacionados con el estreñimiento sin efectos secundarios graves en pacientes *in vivo*. Además, *A. auricula-judae* es cada vez más popular como "alimento negro" en China debido al alto contenido de melanina. Zou et al. (2010) informaron que el cuerpo fructífero del hongo podría utilizarse como una buena fuente de melanina natural de nuevo tipo. El hongo también se puede aplicar a la extracción asistida por ultrasonido para mejorar la eficiencia de la extracción de melanina.

Dentro de la composición nutricional en las dietas bajas en grasas a menudo se recomiendan para personas con presión arterial alta y enfermedades cerebrovasculares, lo que hace que los hongos negros sean una opción de alimento perfecta para ellos. Se encuentran al menos 18 aminoácidos en *A. auricula-judae*, incluidos ocho aminoácidos esenciales y tres aminoácidos semiesenciales. Todos estos aminoácidos son cruciales en el crecimiento y desarrollo de niños y adulto (Islam et al., 2021). Los compuestos químicos fueron detectados en *A. auricula-judae* por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El género *Auricularia* presenta una alta gama de especies las cuales sabemos que son comestibles y medicinales por lo que nos lleva a estudiar una especie que sale del complejo mejor estudiado, es decir, de *A. auricula-judae*, por lo cual se decidió aislar y evaluar los metabolitos secundarios de *A. americana*. La cual posee compuestos bioactivos favorables para la salud, lo que le convierte en un alimento nutraceutico o funcional de alta calidad. Entre las principales propiedades medicinales están: antibacteriana, antiviral, antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, antitumoral, cardioprotector, hipoglicémico, anticoagulante, antiplaquetaria y efectos anticancerígenos. Esto con la finalidad de que a mediano plazo se pueda llevar a cabo cultivos en sustratos y con ello dar una alternativa de cultivo y consumo de esta especie en México.

### **4. HIPOTESIS**

*Auricularia americana* es una especie que sale del complejo *A. auricula-judae*, su crecimiento en diferentes agares y medios líquido permitirá seleccionar los mejores para determinar su potencial actividad antioxidante, antimicrobiana y producción de  $\beta$ -glucanos.



## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, antioxidante y producción de  $\beta$  - glucanos de *Auricularia americana* en medio líquido.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Obtener la cepa pura de *Auricularia americana* a partir de esporomas frescos, en diferentes medios de cultivo.
- 2.- Evaluar la velocidad de crecimiento, para llevarlas a crecimiento en medio líquido.
3. Evaluación de biomasa en peso seco de micelio de cada medio líquido.
- 3.-Cuantificar los metabolitos antibacterianos, antioxidantes y  $\beta$  - glucanos en medio líquido de *A. americana*.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Aislamiento de *Auricularia americana*

Se realizaron expediciones micológicas en el bosque de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), recolectándose dos especies de *Auricularia*: 1) *A. americana* y 2) *A. nigricans* especies las cuales fueron localizadas en las siguientes coordenadas N 18° 59' 0.44" WO 99° 14' 26.8", a 2952 m s.n.m. La recolecta consistió en extraer el cuerpo fructífero, el cual fue envuelto en papel y colocado en una bolsa, codificada con el nombre común de la especie (Fig. 2). La identificación se realizó en el laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas (LEFIP) del Centro de Investigación en Biotecnología. Se limpiaron los cuerpos fructíferos con agua destilada, se pusieron a hidratar ya que los cuerpos fructíferos se encontraron secos en el bosque de donde fueron extraídos.

Para su cultivo, se utilizaron medios sólidos para el aislamiento de la cepa, empleando entre ellos: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (EMA), Harina de Trigo Integral (HIT) y M17 (este último es un medio que se generó en el laboratorio donde se llevó a cabo el presente trabajo) para el aislamiento de la especie de interés, que es *A. americana*, se tomaron pequeños trozos de contexto (parte interna del basidioma, la cual no está expuesta a la

superficie y con ello evitar contaminación) de los cuerpos fructíferos y se colocaron en los medios ya mencionados, se mantuvieron a una temperatura de 25°C.

Se estuvo midiendo el tamaño del micelio todos los días (ya que desde el día uno hubo crecimiento) de cada una de las cajas Petri con los diferentes medios de cultivo, para evaluar la velocidad de crecimiento.



Figura 2. Especies de *Auricularia* recolectadas alrededor de la UAEM. A) *A. nigricans* y B) *A. americana* (Fotos propias).

## 7.2 Cultivo en medios líquidos

Una vez aislada la cepa de *Auricularia americana* y evaluada la velocidad de crecimiento, se tomó la decisión de colocar en cultivo líquido en los siguientes medios para la obtención de metabolitos secundarios: Extracto de Malta y M17 este último medio está constituido a base de glucosa, levadura y sales de sulfato (no se indican las concentraciones que se usan por litro ya que este medio está en proceso de patentamiento). Se colocaron tres discos de 1cm de la cepa previamente aislada por cada 500mL de medio líquido en matraces, se colocaron en el agitador a 121rpm. Cada dos días se filtró el sobrenadante, obteniendo el micelio que se produjo, con la finalidad de saber que biomasa se generó y hacer la evaluación de los metabolitos secundarios (del sobrenadante).

Se tomó la decisión de filtrar cada dos días ya que se pudo observar el crecimiento de pellets o esferas de micelio desde el día dos, y así hasta el día 16 en el cual ya no hubo más crecimiento. Se tuvieron tres matraces por cada medio por cada día de obtención de sobrenadante. En cada muestra se llevó a cabo los análisis de actividad antimicrobiana, estrés oxidativo y producción de  $\beta$ -glucanos.

### 7.3 Filtración de la biomasa y obtención de los sobrenadantes

Se filtró con un papel filtro Whatman No. 2, previamente tarados. El papel filtro se colocó en el embudo donde se filtró en el cultivo y se separó el micelio del sobrenadante. Los papeles filtro con la biomasa filtrada proveniente de tres matraces independientes de cada condición experimental se llevó a la incubadora para su secado y posteriormente su pesado. En paralelo los micelios de otros tres matraces de cada condición experimental se colectaron y se lavaron tres veces con agua tetra-destilada y se guardaron a -80° C para ser analizados por HPLC-PR. El sobrenadante se colocó en tubos falcón de 50 ml y se guardó en un ultracongelador a -80°C para su posterior análisis de resultados.

La biomasa se calculó con la siguiente fórmula:

$$PPFCB - PPFSB = \text{Diferencia de peso (g)} \times \frac{1000 \text{ mL}}{\text{Volumén}}$$

Dónde: PPFCB= peso del papel filtro con biomasa.

PPFSB= peso del papel filtro sin biomasa.

### 7.4 Actividad antimicrobiana

Se caracterizaron los microorganismos a evaluar y se realizó la curva de crecimiento de cada uno de ellos. En tubos de ensayo se adicionaron 4.5mL de medio Müller-Hinton y se inoculó una colonia proveniente de un cultivo Müller-Hinton sólido de cada cepa a evaluar incubando a 35°C. Se midió el crecimiento bacteriano por densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 625nm en el espectrofotómetro, cada hora durante 12h. Los resultados obtenidos se graficaron y así se obtuvo la cinética de crecimiento de cada microorganismo (CLSI, 2018). Se llevó a cabo el crecimiento de las cepas *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 25465) en medio Müller Hinton líquido, incubando estas cepas a 35°C hasta que alcanzaron una fase de crecimiento exponencial obteniendo en cuenta la curva de crecimiento ya establecida y posteriormente se ajustó la absorbancia a 0.5 en la escala de McFarland (1.5x10<sup>8</sup> UFC/mL). Posteriormente se colocó en una placa de ELISA 100 µL de concentraciones decrecientes de los péptidos (50-6.25 µM) en pocillos independientes y por triplicado. Posteriormente se añadieron 100 µL del inóculo de bacterias en medio líquido, la placa se incubó a 35°C. La

cinética de inhibición del crecimiento bacteriano se monitoreó durante 12 h, por absorbancia a 650 nm en el espectrofotómetro y se tomó un punto final a las 24 horas. (CLSI, 2018; Rodríguez et al., 2014). Con las absorbancias obtenidas se procedió a calcular los porcentajes de inhibición de las diferentes concentraciones del péptido frente ambas cepas. El porcentaje de inhibición se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Abs625 de la muestra con péptido} - \text{Abs625 de la muestra a tratar con medio de cultivo}}{\text{Abs625 de la muestra con ampicilina} - \text{Abs625 de la muestra tratada con medio}}$$

### **7.5 Actividad antimicrobiana en difusión en placa**

Para determinar la actividad antimicrobiana de los péptidos se realizaron ensayos empleando la metodología de difusión radial en placa de agar de acuerdo con la CLSI. Una colonia se inoculó en 4.5mL de caldo o medio líquido Müller-Hinton incubándola a 35°C. Una vez alcanzado el tiempo y absorbancia determinadas en la cinética de crecimiento se procedió a ajustar la absorbancia obtenida a 0.5 en la escala 23 McFarland (0.05 mL BaCl<sub>2</sub>, 9.95 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (McFarland, 1907; Baker et al., 1983). Para tener presente una densidad bacteriana de 1.5x10<sup>8</sup> UFC/ml en fase de crecimiento exponencial. Se adiciono 1mL a cada cultivo en tubos de ensayo que contenían nueve mililitros de medio de cultivo Müller-Hinton agar estéril tibio sin solidificar, se vertieron sobre cajas de Petri, las cuales obtuvieron una capa de 15mL del mismo agar para obtener como volumen final 25ml. Una vez solidificado el medio de cultivo con el inóculo, se adicionaron 5 µl de los péptidos antimicrobianos a diferentes concentraciones (50-6.25µM) y se incubaron por un lapso de 12h a 35°C. Como control positivo se adicionó una concentración de 10 mg/mL de ampicilina, además del péptido Pin2 (12.5µM) y como control negativo se utilizó agua tetra-destilada.

### **7.6 Técnica β-1,3-1,6-Glucanos**

Se utilizó 350 µL del extracto con 300 µL de 0.2M de buffer ácido cítrico/NaOH pH 7 y 50 µL de “solución colorante” (8 mg de rojo Congo diluido en 10 mL de buffer) se agregó y se midió la absorbancia a 523 nm, contra 350 µL de agua destilada, 300 µL de buffer y 50 µL de

solución colorante como blanco (Nitschke et al., 2011). El contenido total de  $\beta$ -glucanos es expresado en:

$$mg \text{ de } \beta - \text{glucanos} \times \text{gramos de hongo seco}$$

## 7.7 Antioxidante

Para antioxidantes se utilizaron dos técnicas: Método 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) y Método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Método 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acido) (ABTS). El radical libre ABTS se obtuvo tras la reacción del ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2.6mM concentración final). La solución de trabajo se preparó mediante la mezcla de las dos soluciones stock en cantidades equitativas, seguidas de una reacción por 12 a 16h a temperatura ambiente (25°C), en la oscuridad. Una vez formado el radical ABTS, se tomó 1000 $\mu$ L de éste y se diluye con etanol hasta obtener una absorbancia comprendida entre  $0.700 \pm 0.2$ . Una vez ajustado, se llevó a cabo la reacción con 2 $\mu$ L de muestra y 198 $\mu$ L del radical ABTS, se utilizó una placa de ELISA de 96 pocillos por triplicado. La mezcla se dejó actuar en la oscuridad a temperatura ambiente por 6min. La disminución de la coloración se expresó como el porcentaje de inhibición del ABTS. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 734nm. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs (t=0)} - \text{Abs (t=6)} \times 100}{\text{Abs (t=0)}}$$

Método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Para determinar la capacidad antioxidante se mezclaron 2 $\mu$ L de la solución del extracto de muestra con 180 $\mu$ L de DPPH a 1mM preparado con etanol. La mezcla se dejó actuar por triplicado en una placa de ELISA en oscuridad a temperatura ambiente por 30min. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 517nm (Morales et al., 2008). El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs (t=0)} - \text{Abs (t=6)} \times 100}{\text{Abs (t=0)}}$$

Dónde: Abs (t=0) es la absorbancia del radical DPPH a tiempo cero.

Abs (t=30) es la absorbancia del DPPH y el extracto a tiempo de 30 min.

### 7.8 Determinación de fenoles totales

El reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Se utilizó para determinar la cantidad de compuestos fenólicos totales en cada extracto obtenido del cuerpo fructífero de la especie *A. americana*. El número de grupos –OH que es potencialmente oxidable en cada extracto, creará un cambio de color de amarillo a azul. Se colocaron 2 ml del extracto del hongo y se mezclaron con 1.0mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 3min se adicionó solución saturada de carbono de sodio a 1M. La reacción se mantendrá en oscuridad por 60 min., y se leyó la absorbancia a 725 y 756nm. Se utilizará pirogalol como estándar para la curva de calibración (0.02-0.14 mg/ml).

### 7.9 Análisis estadísticos

Se utilizó el software de GraphPad Prism 6 para realizar las pruebas estadísticas.

## 8. RESULTADOS

Se obtuvieron tres recolectas de *Auricularia* en campo, determinando la especie como *A. americana* (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2022): basidioma de hasta 90 mm de diámetro, por 1–7 mm de grosor, solitario a cespitoso, sésil a subestipitado, convexo a auriculado, algunas veces con el margen lobado, redondo a subredondo, marrón, marrón claro a oscuro a marrón vináceo, himenóforo liso a ligeramente sulcado, abhimenio velutinoso a viloso, con pelos blanquecinos. Micromorfología: Médula ausente, zona pilosa de 70–120 μm de grosor, zona compacta de 40–90 μm de grosor, zona subcompacta superior de 35–75 μm de grosor, zona laxa intermedia de 350–700 μm de grosor, zona subcompacta inferior de 100–350 μm de grosor, himenio de 65–120 μm de grosor, pelos del abhimenio de 60–180 × 4.5–6 μm, de pared gruesa, hifas con

fíbulas, basidios de  $50\text{--}78 \times 4\text{--}6.5 \mu\text{m}$ , basidiosporas hialinas, alantoides, de  $13\text{--}16 \times 4.5\text{--}6 \mu\text{m}$ ,  $Q = 2.4\text{--}3.2$  (Fig. 3).

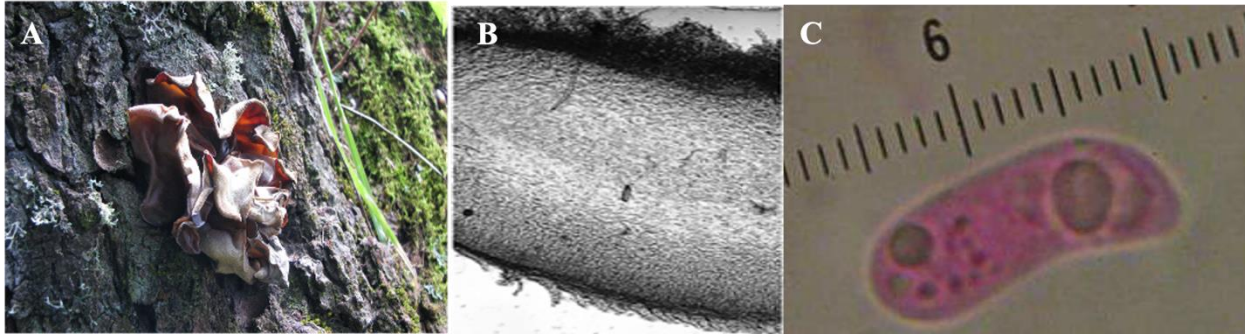


Figura 3. A) Basidioma de *Auricularia americana* en fresco; B) Corte donde se observa que no hay médula presente; c) Basidiospora alantoides (Fotos Ibeth Rodríguez Gutiérrez).

### 8.1 Obtención de la cepa

Los aislamientos a partir de esporomas se obtuvieron con éxito en los medios EMA y M17, sin embargo, en PDA e HIT se contaminaron y no se pudo aislar (Fig. 4). La morfología que se obtuvo del aislamiento fue un micelio algodonoso de color blanco y con el paso del tiempo se tornó de color negro formando gúttulas del mismo color.



Figura 4. Aislamiento de *Auricularia americana*. A) Cepa con tres días de crecimiento, se observa de color blanco con cierta coloración rosada. B) Cepa a los siete días de crecimiento, el micelio se torna de color negro (Fotos Ibeth Rodríguez Gutiérrez).

### 8.2 Velocidad de crecimiento

El crecimiento se dio a partir de las 24 horas después de sembrar en caja Petri, cabe señalar que se tuvieron seis repeticiones por medio; las características de cada uno de los medios (EMA



y M17) se describen en (Tabla 2), en ambos se observa la presencia de exudados oscuros que aparecen conforme pasan los días y persisten a lo largo del tiempo.

Tabla 2 Descripción de las cepas de *Auricularia americana*.

Medio de cultivo	Densidad	Textura	Color
EMA	Regular	Aterciopelada	Negro con exudados
M17	Alta	Velosa	Negro con exudados

La coloración de los dos medios se torna de color marrón y en la periferia con tono rosa claro; el crecimiento periférico fue regular. Ambos medios (EMA y M17) tuvieron crecimiento máximo de 8 cm, siendo M17 el mejor (3 días, 1.54 cm/día) y después EMA (5 días, 1.91 cm/día) (Fig. 5).

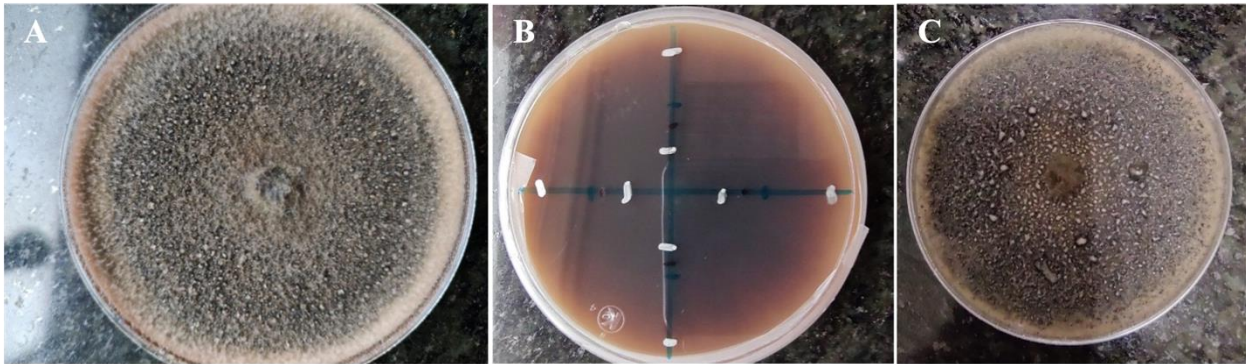


Figura 5. Crecimiento de *Auricularia americana* en M17. A) Micelio blanquecino en la periferia (joven); B) Medición de velocidad de crecimiento; C) Exudados en el micelio (Fotos Ibeth Rodríguez Gutiérrez).

### 8.3 Biomasa del medio líquido

La biomasa en peso seco se monitoreo a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 días en cada medio, cabe señalar que se tuvieron tres muestras por medio por día monitoreado, la mayor cantidad de micelio se presentó en el Extracto de Malta, donde se muestra una gráfica de desviación estándar donde presenta variabilidad de datos graficados (Fig. 6), cabe mencionar que se formaron pellets. Se observaron pellets de diámetro variable, de color blanco-grisáceo, escasos, pero más abundantes en medio M17.



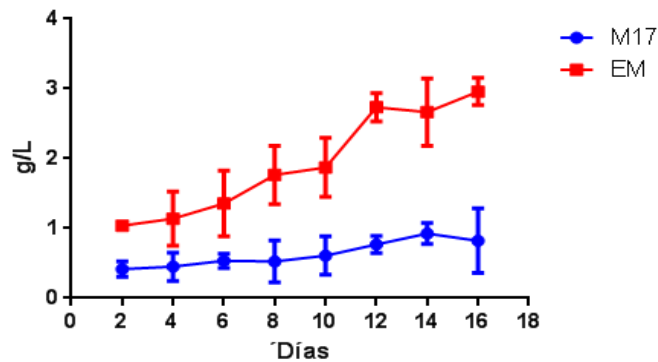


Figura 6. Crecimiento del micelio de *Auricularia americana* en los medios líquidos, expresado la biomasa en peso seco.

#### 8.4 Contenido total de fenoles presentes en los extractos crudos de *Auricularia americana*

Para obtener el contenido total de fenoles se utilizaron los extractos por triplicado por medio por día monitoreado. Se realizaron las curvas estándar con el reactivo pirogalol en las dos absorbancias utilizadas de 725 y 765nm (Fig. 7). En sobrenadante del cultivo de *A. americana* el medio M17, se presentó mayor concentración de compuestos fenólicos totales en el día dos, al día 12 se presentó la menor concentración (Tabla 3, Fig.8). Mientras que para el sobrenadante del medio de cultivo EM hubo una mayor diferencia para la lectura a 725 nm, el día 12 obtuvo la mayor concentración. Mientras que en la lectura a 765nm fue al segundo día. En ambos casos el día con menor concentración fue a los seis días (Tabla 4). Este valor indica el contenido total de compuestos fenólicos en los sobrenadantes que no necesariamente son antioxidantes pueden ser moléculas con otras actividades biológicas.

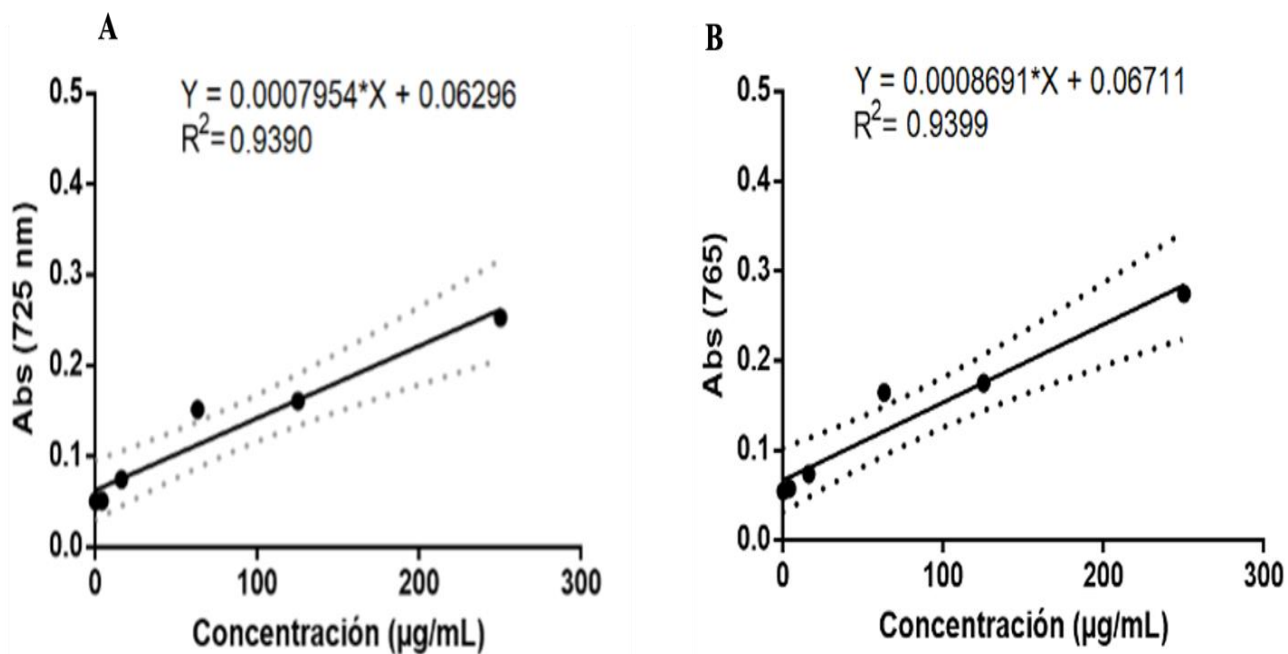


Figura 7. Curva estándar de pirogalol, A) a 725 nm; B) a 765 nm.

Tabla 3. Concentración de fenoles totales en extractos crudos de *Auricularia americana* en medio M17; A) a 725nm, B) a 765nm; cada medición se realizo por triplicado.

A			B		
Curva 725 nm			Curva 765 nm		
y= 0.0006489x + 0.06198			y= 0.0006489x + 0.06198		
Día	Muestra de abs	Concentración (ug/mL)	Día	Muestra de abs	Concentración (ug/mL)
2	0.2395	221.909	2	0.2644	227.043
4	0.2309	211.097	4	0.2457	205.527
6	0.1437	101.592	6	0.1583	98.635
8	0.1459	104.316	8	0.1610	108.070
10	0.1335	88.685	10	0.1801	130.046
12	0.1248	77.831	12	0.1297	67.721
14	0.1731	138.513	14	0.2056	159.310
16	0.1393	95.935	16	0.157	103.429

Tabla 4. Concentración de fenoles totales en extractos crudos de *A. americana* en medio EM A) 725nm B) a 765nm; cada medición se realizo por triplicado.

A			B		
Curva 725 nm			Curva 765 nm		
$y = 0.0006489x + 0.06198$			$y = 0.0006489x + 0.06198$		
Día	Muestra de abs	Concentración (ug/mL)	Día	Muestra de abs	Concentración (ug/mL)
2	0.2062	160.077	2	0.1981	169.860
4	0.2202	176.148	4	0.1869	155.905
6	0.1588	105.538	6	0.1278	81.561
8	0.1747	123.76	8	0.1447	102.766
10	0.163	110.333	10	0.1424	99.916
12	0.2227	179.063	12	0.1861	154.815
14	0.19	141.399	14	0.1520	111.902
16	0.1783	127.975	16	0.1402	97.150

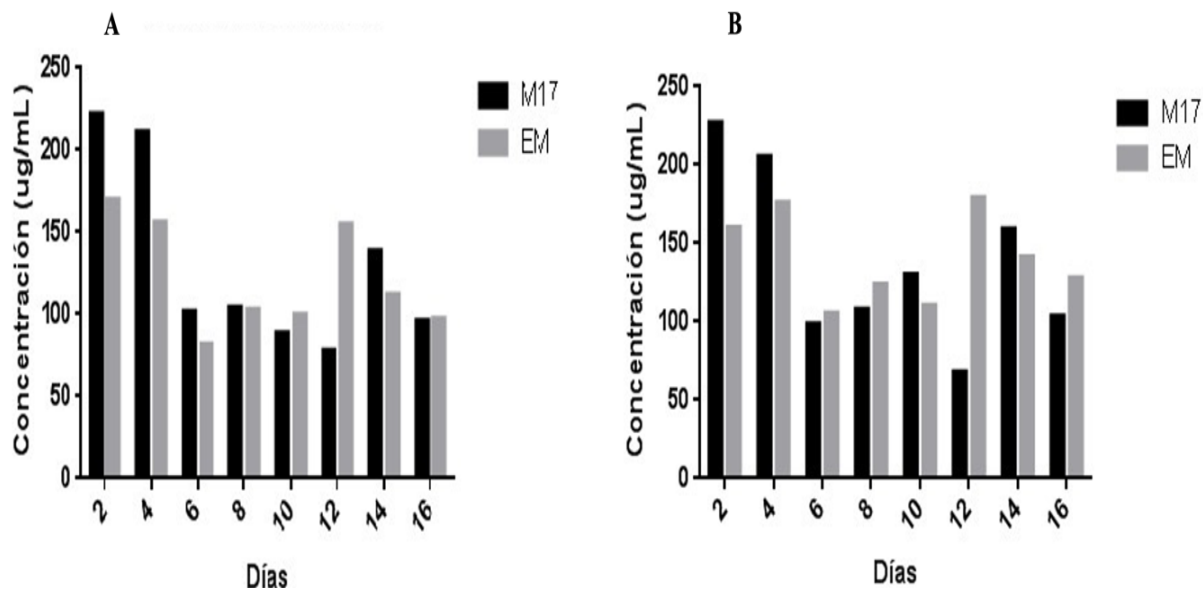


Figura 8. Concentración de fenoles totales del cultivo de *Auricularia americana* en medio M17 y EM. A) absorbancia a 725 nm; B) absorbancia a 765 nm; cada medición se realizo por triplicado.

## 8.5 Actividad antioxidante presente en los extractos crudos de *Auricularia americana*

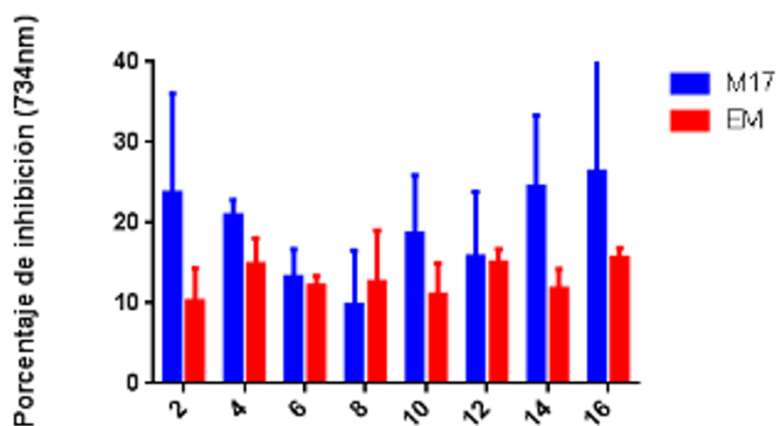
### 8.5.1 Inhibición del radical ABTS

Los mayores valores de inhibición del radical ABTS en el medio M17 y EM se presentaron el día 16 en ambos con el 26.3 y 15.6% respectivamente; mientras que en M17 el menor porcentaje se registró al día 8 con 9.8% y en EM al día 2 con 10.2%. Para el medio M17 el día 2 presentó buenos porcentajes 23.7, sin embargo, con forme pasaron los días este rendimiento bajó y es hasta el día 10 que gradualmente suben los valores, incluso el día 14 subió hasta 26.3 %.

Para EM el comportamiento fue diferente ya que inicio con un porcentaje bajo de 10.2%, tuvo fluctuaciones al paso del tiempo, algunas veces subían los niveles y en otras bajaban, hasta llegar al valor máximo en el día 16 con 15.6%. Con una diferencia significativa entre los valores alcanzados a los días 12 y 15 (Fig. 9).

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del radical ABTS

Porcentaje de inhibición del radical ABTS		
Día	M17	EM
2	23.7%	10.2%
4	20.9%	14.8%
6	13.2%	12.1%
8	9.8%	12.6%
10	18.6%	11.0%
12	15.7%	15.0%
14	24.4%	11.7%
16	26.3%	15.6%



**Figura 9.** Porcentaje de inhibición del radical ABTS de extractos crudos de *Auricularia americana* en medio M17 y EM. Se observa diferencias significativas

### 8.5.2 Inhibición del radical DPPH

Los valores de inhibición mayores del radical DPPH en el M17 y EM se presentaron en el día 2 siendo estos respectivamente de 27.5 y 26.3%; mientras que los valores más bajos en ambos medios se registraron en el día seis con 22.6% en M17 y 23.8% en medio EM. Ambos medios tuvieron fluctuaciones en los porcentajes de inhibición a lo largo del tiempo, comenzaron con los valores más altos y posteriormente bajaron, después subieron y para el último día (16) los valores fueron de 25.8% en M17 y 25.7% en EM (Fig. 10). Por tanto, el día 2 de la cinética es donde se encuentra la mayor actividad antioxidante con una diferencia significativa con la obtenida al día 16.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del DPPH

Porcentaje de inhibición del radical DPPH		
Día	M17	EM
2	27.5%	26.3%
4	25.1%	24.9%
6	22.6%	23.8%
8	23.3%	26.2%
10	25.4%	24.3%
12	26.1%	24.5%
14	26.4%	25.1%
16	25.8%	25.7%

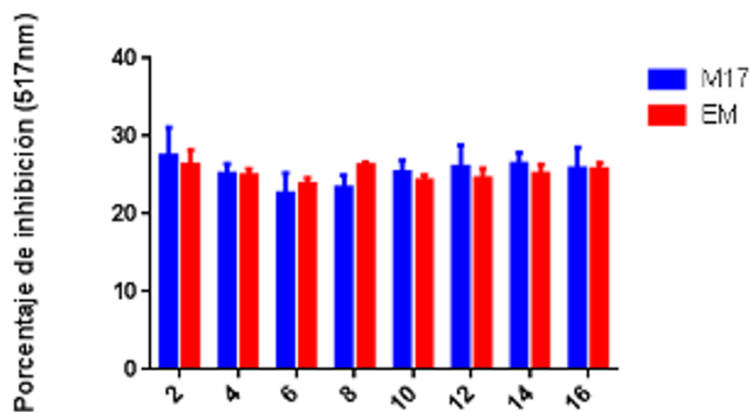


Figura 10. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de extractos crudos de *A. americana* en M17 y EM.

### 8.5.3 Actividad antimicrobiana presente en los extractos crudos de *Auricularia americana*

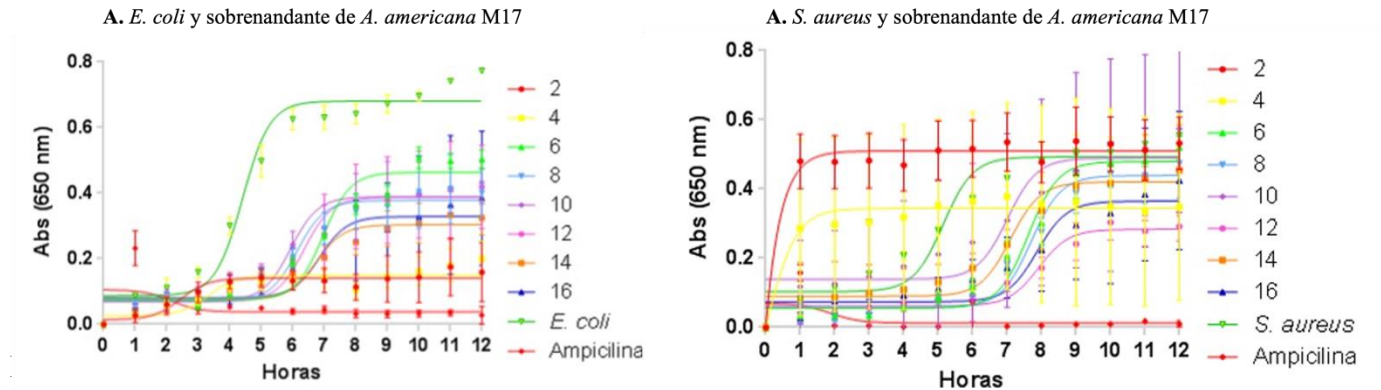
La ampicilina es el control negativo o de inhibición total del crecimiento bacteriano por tanto se observa una línea recta y no una curva de crecimiento. La curva de crecimiento normal se observa en el control positivo de crecimiento para *E. coli* y *S. aureus*, se pueden observar la fase de adaptación o Lag, la fase exponencial o Log y la fase estacionaria en todas las cinéticas de crecimiento.

La actividad bacteriostática se presenta cuando solo se inhibe el crecimiento por cierto tiempo logrando solo un porcentaje inhibitorio de las bacterias y el efecto bactericida se presenta cuando no existe ningún crecimiento de las bacterias a lo largo del tiempo del experimento, con ello los extractos del hongo actúan como antimicrobiano bactericida. En los extractos de *Auricularia americana* obtenidos de los medios M17 y EM, se puede observar que tienen actividad antibacteriana con ambas cepas siendo más fuerte el efecto en la bacteria *E. coli* que es una Gram negativa en comparación con *S. aureus* que es Gram positiva.

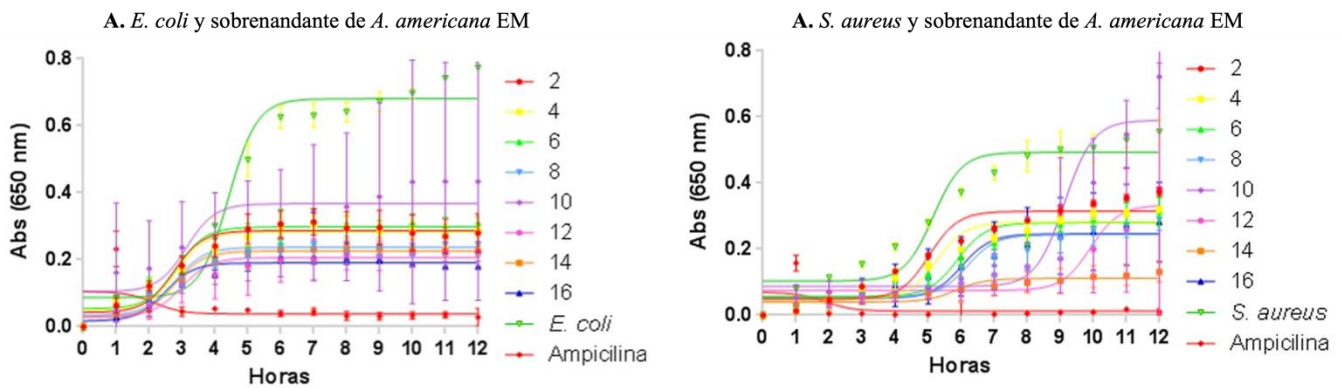
Los efectos en general son bacteriostáticos ya que retrasan el crecimiento de ambas bacterias. *E.coli* en medio M17 presentó una curva de crecimiento con una fase de adaptación o Lag de 2 horas, a partir de la hora 5 comienza su fase exponencial y en la hora 8 su fase estacionaria, teniendo una actividad más destacable el día 2 y 4 donde la bacteria presenta un crecimiento menor.

En *S. aureus* la fase adaptativa o Lag duró 3 horas, la mayor parte de los días el crecimiento exponencial empieza en la hora 5 y la fase estacionaria el día 8, excepto cuando se usaron los sobrenadantes obtenidos en los días 4 y 6 donde la bacteria de *E. coli* creció más que el control.

En el caso de *S. aureus*, ésta bacteria creció más que el control con los extractos de los días 2, 4 y 6. La actividad bacteriostática más fuerte contra *E. coli* se presentó con el sobrenadante del día 14 y para *S.aureus* el del día 12 (Fig. 11).



fase de adaptación o Lag dura 2 horas, el día 3 comienza su fase exponencial y en la hora 6 su fase estacionaria. El extracto que mayor efecto bacteriostático ejerce fue el del día 16. En *S. aureus* su fase de adaptación o Lag dura 3 horas, la fase exponencial empezó a las 3 horas y la fase estacionaria a la hora 6, esto se observa en el control de crecimiento positivo (línea en verde). El mejor extracto que ejerce actividad bacteriostática fue el del día 14 (Fig. 12).

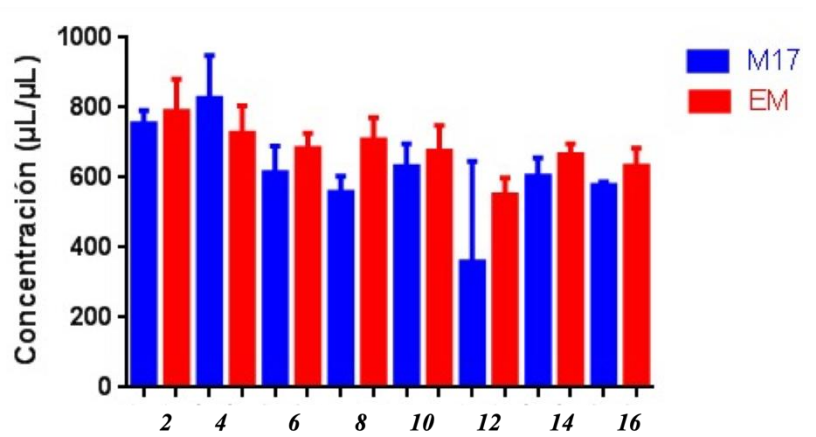


**Figura 12.** Cinética de inhibición de crecimiento con sobrenadantes de *A. americana* en EM. A) Sobrenadante de *A. americana* sobre *E coli*; B) Sobrenadante de *A. americana* sobre *S. aureus*.

### 8.5.4 $\beta$ -glucanos presentes en los extractos crudos de *Auricularia americana*

La concentración de  $\beta$ -glucanos más alto para el medio M17 se presentó en el día cuatro con 826.16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , mientras que para EM fue el primer día de 788.97  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , la menor concentración para ambos medios se presentó en el día 12, 358.51 y 550.27  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  respectivamente (Fig. 13).

Concentración de Beta glucanos ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )		
Día	M17	EM
2	753.46	788.97
4	826.16	726.75
6	614.52	682.91
8	557.62	707.99
10	631.42	675.02
12	358.51	550.27
14	604.58	665.16
16	578.03	632.97



**Figura 13.** Concentración de  $\beta$ -glucanos a lo largo de ocho tomas de muestras de *Auricularia americana* en medio M17 y EM.

## 9. DISCUSIÓN.

La biomasa presente en medio de cultivo líquido en M17 y EM se observó que hubo mayor producción fue en el día 16 alcanzando 6 g/L en contraste con 2 g/L obtenidos el mismo día en medio EM, se observaron pellets de diámetro variable, de color blanco-grisáceo, escasos, pero más abundantes en medio M17. Es importante resaltar que no existen publicaciones que reporten la morfología de los pellets, los cuales pueden ser una característica de la especie. A un hay reportes de artículos que marquen la producción de biomasa de esta especie *A. americana*

La actividad antimicrobiana presente en los extractos crudos de *Auricularia americana* obtenidos de los medios M17 y EM, se demostró en ambas cepas siendo más potente el efecto



en la bacteria *Escherichia. coli* una Gram negativa en comparación con *Staphylococcus aureus* que es Gram positiva. Los efectos en general fueron bacteriostáticos sobre ambos tipos de bacterias. Gebreyohannes et al. (2019) reportan que los extractos de agua caliente y etanólicos de varias especies de *Auricularia* silvestres en Kenya mostraron actividades antimicrobianas prometedoras, principalmente posee una fuerte actividad antibacteriana contra *S. aureus*. Es importante resaltar que en hongos el método de Difusión de Disco de Kirby-Bauer es la más utilizada, teniendo resultados de *A. auricula-judae* de inhibición en *E. coli* de 1.66 a 2.62 mm, mientras que para *A. polytricha* sobre *E. coli* fue de 7 a 13mm, mientras que para *S. aureus* fue de 5 a 7mm (Gbolagade y Fasidi, 2005; Reyes-Morales, 2006). Existen trabajo en los cuales se ha demostrado la eficiencia como antimicrobiano, sin embargo, estos a partir de ejemplares herborizados mediante extracción por disolventes como agua, metanol y etanol entre otros (Subrata-Giri et al., 2012; Sang y Tae, 2016).

Los sobrenadantes de *A. americana* mostraron una actividad antioxidantes más alta en los días 2, 14 y 16 inhibiendo el radical ABTS con un 26% en medio M17 y 27.5% de DPPH sin una diferencia significativa entre ambos métodos de cuantificación, lo cual muestra que los extractos evaluados tienen actividades comparables por ambos métodos y por tanto que estos son reproducibles al momento de medir la actividad antioxidante. Para *A. polytricha* en extractos de metanol se ha reportado que inhibe un 50% la actividad en antioxidante del DPPH en concentraciones de 100 µg/mL (Anno et al., 2021; Ng y Rosman, 2019), en extractos acuosos se ha reportado un 28.79% que inhibición en concentraciones de 100 µg/mL (Chen y Xue, 2018) para *A. auricula-judae* se ha reportado inhibición de un 25% a un 36% en extracto acuoso (Cheng et al., 2018; Choi et al., 2018) y en extractos de metanol de un 30% a 40% de inhibición (Sang y Tae, 2016; Wu et al, 2001).

De la misma manera que los antimicrobianos, la medición de antioxidantes se ha realizado en diversas especies de *Auricularia* a partir de material fresco y herborizado, mediante técnicas de extracción por disolventes en agua caliente, etanol y metanol (Chen et al., 2018; Khaskeli et al., 2018).

Los fenoles totales presentes en los extractos crudos de *Auricularia americana* se obtuvieron mediante una curva estándar a diferentes concentraciones utilizando el reactivo pirogalol. La concentración de compuestos fenólicos a 725 y 765 nm de absorbancia registro la mayor concentración de fenoles totales en el día 2 y la menor al día 12 en los medios M17 y EM, Se

basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende la concentración. Anteriormente Ortiz y colaboradores en el 2016, mencionaron que en *Auricularia auricula-judae* se encuentran presentes fenoles totales y Cárdenas Sandoval en el 2007 menciona que se encontraron cantidades regulares de fenoles y glucósidos en los estados tierno y maduro del hongo y poca cantidad de compuestos de alcaloides en *Auricularia aurícula*.

Los resultados obtenidos de  $\beta$ -glucanos presentes en los extractos crudos de *Auricularia americana* indican que los  $\beta$ -glucanos se obtuvieron en mayor cantidad en el medio EM en comparación con el medio M17. En el 2018, Qiu et al., mencionaron que *A. auricula-judae* contiene cantidades ricas de  $\beta$ -glucanos, que defienden contra enfermedades inflamatorias, respaldan el sistema inmunitario.

## 10. CONCLUSIÓN.

Las conclusiones en base al trabajo realizado son las siguientes:

1.- Se logró obtener la cepa pura de *Auricularia americana* a partir de esporomas frescos, en diferentes medios de cultivo.

Se logró el crecimiento en medio de cultivo líquido donde hubo mayor producción de biomasa en el día 12 con EM.

2.-Se analizaron los datos antimicrobianos de *Auricularia americana* y fueron no considerados antimicrobianos, pero si resultaron ser buenos bacteriostáticos, pues impidieron el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

3.-Los sobrenadantes de la especie *Auricularia americana* mostraron una buena actividad antioxidantes, inhibiendo el radical ABTS con un 26% del medio EM y DPPH en donde la mayor inhibición fue 27.5% desde el día 2.

4.- Los sobrenadantes de la especie *Auricularia americana*, mostraron una buena actividad antioxidantes, inhibiendo el radical ABTS con un 26% del medio EM y de DPPH en donde la mayor inhibición fue 27.5% desde el día 2.

5.- Hubo buena producción de  $\beta$ -glucanos presentes en los extractos crudos de *A. americana*, la concentración de  $\beta$ -glucanos más alto del medio EM con una concentración de 788.97 ug/mL.

6.- Los compuestos fenólicos totales en los sobrenadantes *Auricularia americana* dieron buenos resultados en el medio M17 en las dos mediciones de 725 y 765nm.

## 11. PERSPECTIVAS

1.- Debido al alta contenido de antioxidantes de la especie *Auricularia americana* se podría realizar productos cosméticos como cremas, serúm para antienvjecimiento lo que podría ayudar como renovador de células de la piel.

2.- Debido a su buena producción de Betaglucanos y realizando más estudios a fondo se podría realizar un tratamiento para el cáncer.

## 13. BIBLIOGRAFIA

Anno H., Anon H., Gisèle K., Kouassi A., Kouadio J., (2021). Phenolic compound and antioxidant activity of two slightly consumed wild mushrooms (*Lentinus squarrosulus* and *Auricularia politrach*) in three regions from center Ivory Coast Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 9(10): 1931-1937. DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i10.1931-1937.4454>.

Ar, B., Rapior, S., Pe, M., Kakumyan, P., Kd, H., & Xu, J. (2019). A review of the polysaccharide, protein and selected nutrient content of *Auricularia*, and their potential pharmacological value. *Mycosphere*, 10 (May), 579–607. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/10>

Brand-Williams B., Berset W., (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH•free radical method. *LWT - Food Science and Technology*; 30: 609-615.

Cai, M., Lin, Y., Luo, Yl, Liang, H.-h. y Sun, P. (2015). Actividades de extracción, antimicrobianas y antioxidantes de los polisacáridos crudos del hongo medicinal de la oreja de madera *Auricularia auricula-judae* (basidiomicetos superiores). *Revista internacional de hongos medicinales*, 17, 591– 600.

Cardenas Sandoval, William., (2017). “TAMIZAJE FITOQUIMICO, POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, DEL HONGO COMESTIBLE (*Auricularia aurícula*)” Universidad Nacional Agraria de la Selva 12,35-36 DOI: <https://hdl.handle.net/20.500.14292/1270>

Chang, AT, Frías, RR, Álvarez, LV, Bigol, U. & Guzmán, J. (2019). Actividad antibacteriana comparativa 58, 1165-1224 del quitosano comercial y el quitosano extraído de *Auricularia* sp. Biocatálisis y biotecnología Ganesan, K., Suka agricola, 17 183-195.

Chen Y. y Xue Y., (2018). Purification, chemical characterization and antioxidant activities of a novel polysaccharide from *Auricularia polytricha*, International Journal of Biological Macromolecules. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.160.

Choi, YJ. Park, IS, Kim, M\_H. Kwon, B. Choo, YM, Jeong, Si, et al (2019). El extracto de hongo medicinal *Auricularia auricula-judae* (Bull.) tiene actividad antioxidante y promueve la biosíntesis de procolágeno en las células HaCaT. Investigación de productos naturales 33,3283-3286.

Fan, L., Zhang, S., Yu, L. y Ma, L. (2007). Evaluación de la propiedad antioxidante y la calidad de panes que contienen harina de polisacárido de *Auricularia auricula*. Química de los alimentos, 101,1158-116.

Gibson, I. (2022). *Auricularia americana* group Parmasto & I. Parmasto ex Audet, Boulet & Sirard group tree-ear Auriculariaceae. *E-FLORA BC: ATLAS ELECTRÓNICO DE LA FLORA DE LA COLUMBIA BRITÁNICA*, 1. <https://linnet.geog.ubc.ca/Atlas/Atlas.aspx?sciname=Auricularia americana group&noTransfer=1>

Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., & Sbhatu, D. B. (2019). Investigation of antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of *Auricularia* and *Termitomyces* species of mushrooms. The Scientific World Journal, 2019.

Gbolagade J.S. y Fasidi I.O., (2005). Antimicrobial Activities of Some Selected Nigerian Mushrooms, African Journal of Biomedical Research, 8: 83- 87.

Hassan, F. R. H., & Medany, G. M. (2012). Studies on Submerged Culture Conditions for Mycelial Biomass Production of Wood Ears Mushroom (*Auricularia polytricha*). *Middle East Journal of Agriculture Research*, 1(1), 33–39.

Islam, T., Yu, X., & Xu, B. (2016). Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China, *LWT-Food Science and Technology*, 72, 423-431.

Islam, T., Ganesan, K., & Xu, B. (2021). Insights into health-promoting effects of Jew's ear (*Auricularia auricula-judae*). *Trends in Food Science & Technology*, 114, 552-569.

Khaskheli A. A., Khaskheli S. G., Liu Y., Sheikh S. A., Wang Y. F., Homaida M. A., Soomro A. H., Xiao D., Dars A. G., Lakho J. A., Hu S., Huang W., (2018). Characterization and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from three edible mushrooms, *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(12): 133-138. DOI: 10.5897/JMPR2017.6441.

Kho,YS, Vikineswary, S., Abdulan, N., Kuppusamy, UR y Oh, HI (2019) Capacidad antioxidante de cuerpos fructíferos frescos y procesados y micelio de *Auricularia auricula-judae* (Fr.) Quel. *Revista de Alimentos Medicinales*, 12, 167–174.

Kim, MY, Seguin, P. Ahm, JK, Kim, JJ, Chun, SC, Kim, EH, et al. (2008). Concentración de compuestos tenólicos y actividades antioxidantes de hongos comestibles y medicinales de Corea. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 56, 7265-7270. Antiproliferativa y perfiles de aminoácidos de extractos etanólicos de hongos comestibles. *Investigación genética y molecular*, 150, 1-14.

López-Pino, J. I. (2016). Propiedades funcionales de los hongos comestibles: Funcional properties of the edible mushrooms. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 26(1), 73-8

Moore, D., & Chiu, S. W. (2001). Fungal products as food. *Bio-exploitation of filamentous fungi*. *Fungal Diversity Press, Hong Kong*, 223-251.

Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Von Rekowski, R. W., Altenbach, H. J., & Mölleken, H. (2011). A new colorimetric method to quantify  $\beta$ -1, 3-1, 6-glucans in comparison with total  $\beta$ -1, 3-glucans in edible mushrooms. *Food chemistry*, 127(2), 791-796.

Rodríguez-Gutiérrez et al., 2022. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 93 (2022): e9339942 <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2022.93.399>

Odamtten, G. T., Addo, J., & Wiafe-Kwagyan, M. (2022). Record of medicinal Jew's (*Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quel) ear mushroom growing in the Greater Accra Region, Ghana and its possible health values. *Ghana Journal of Science*, 62(2), 25–35. <https://doi.org/10.4314/gjs.v62i2.3>

Ortiz, E., Soto Arroyave, C., Saransi, C., Ayala, K., Faz, L., Benavides, N., Vela, P., Rosero, P., Gómez, W., Huaca Pinchao, J., Reyes Laram, G., Guzmán Torres, R. D., Parrado Castro, G., Duarte Trujillo, S., & Pineda Soto, A. (2016). Banco de recursos genéticos de *Auricularia* spp. con fines industriales. *Revista Bionatura*, 1(3), 139–145.

Panthong, S., Boonsathorn, N. y Chuchawanku, S. (2016). Actividad antioxidante, actividad antiproliferativa y perfiles de aminoácidos de extractos etanólicos de hongos comestibles. *Investigación genética y molecular*, 150, 1-14.

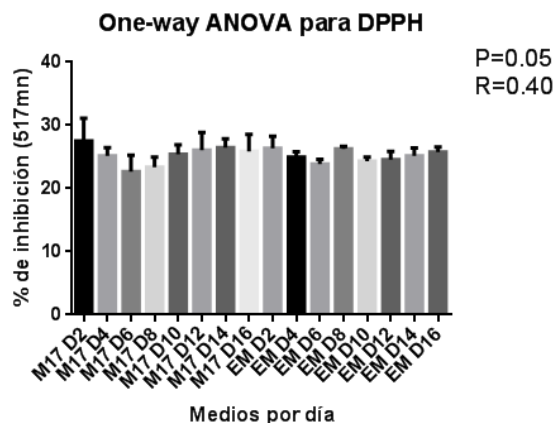
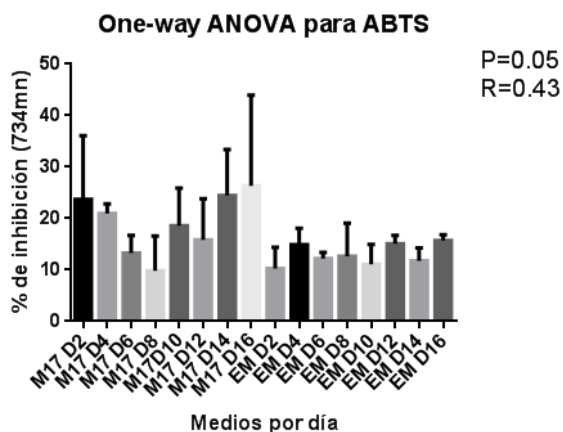
Park, KH, Kim, KJ, Jang, KY y Park, K. (2017). Efecto antiobesidad de *Auricularia* spp. *Hongo*. 21, 47-47

Qiu, J. Zhang. H. Wang, 2. Lo, D. Lio, S. Man, W. et al. (20186). El efecto antitumoral del ácido fólico conjugado-*Auricularia* auricular polisacárido-cisplatino complejo en células de carcinoma de cuello uterino en ratones desnudos. *Revista internacional de macromoléculas biológicas*, 107, 2160-2189.

- Reza, MA, Hossain, MA, Damte, D., Jo, WS, Hu, WH y Park, SC (2015). Esteatosis hepática e hipolipidémica que previene las actividades del hongo medicinal oreja de madera *Auricularia auricula-judae* (basidiomicetos superiores) extracto en etanol in vivo in vitro. *Revista internacional de hongos medicinales*, 17, 723-734.
- Sang C. y Tae J., (2016). Antioxidant Activities and Antimicrobial Effects of Extracts from *Auricularia auricula-judae*, *Journal Korean Soc Food Sci Nutr* 45(3): 327-332. DOI: 10.3746/jkfn.2016.45.3.327
- Sękara, A., Kalisz, A., & Siwulski, M. (2015). *Auricularia spp.* - hongos como nuevos alimentos y agentes terapéuticos - una revisión. *September*. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia67-2015-0001>
- Sierra, S., Rodríguez-Gutiérrez, I., Agustín, L. A. I. S., Castro-Santiuste, S., Cifuentes, J., & Pérez-Ramírez, L. (2012). Hongos tremeloides (Heterobasidiomycetes) de la Reserva de la Biosfera de Calakmul, Campeche, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(1), 23–30. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2012.1.1136>
- Singleton V.L., Orthofer R.O., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*; 299: 152–178.
- Subrata-Giri, Gunjan-Biswas, Prakash-Pradhan, Subhash C. Mandal, Krishnendu Acharya, (2012). Antimicrobial Activities Of Basidiocarps Of Wild, *International Journal of PharmTech Research*, 4(4): 1554-1560.
- Wong, JH, Ng, TB, Chan, HFL, Liu, Q., Man, GOW, Zhang, C2, et al. (2020). Extractos de hongos y compuestos con acción supresora sobre el cáncer de mama: Evidencia de estudios que utilizan células cancerosas cultivadas, animales portadores de tumores y ensayos clínicos, *Microbiología aplicada y biotecnología*, 104, 4675-4703.
- Wu, F., Tohtirjap, A., Fan, L. F., Zhou, L. W., Alvarenga, R. L. M., Gibertoni, T. B., & Dai, Y. C. (2021). Global diversity and updated phylogeny of *Auricularia* (Auriculariales, basidiomycota). *Journal of Fungi*, 7(11), 1–79. <https://doi.org/10.3390/jof7110933>
- Xu, B. Ganesan, K., Mickymaray, S. Alfaiz, FA, Thatchinamoorthi, R. y Aboody, MSA (2020). Eficacia inmunomoduladora y antineoplásica de las especias comunes y su relación con los antioxidantes fenólicos. *Compuestos bioactivos en salud y enfermedad*, 3,15
- Yadav, D., & Negi, P. S. (2021). Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Research International*, 148, 110599.
- Zou Y., Xie C., Fan G., Gu Z., Han Y. (2010) Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de melanina de cuerpos fructíferos de *Auricularia auricular*. *Ciencia Innovadora de los Alimentos y Tecnologías Emergentes* 11: 611–615.

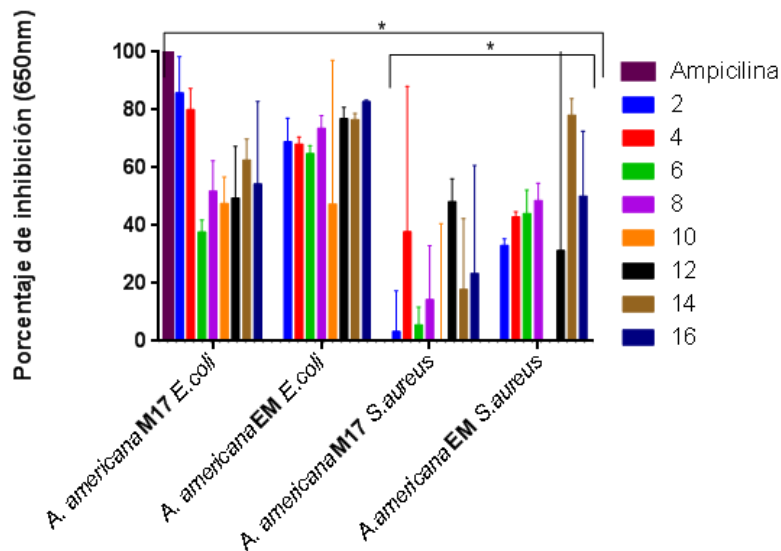
## ANEXOS

Datos significativos en los medios M17 y EM para ABTS y DPPH. La R marca el margen de error.



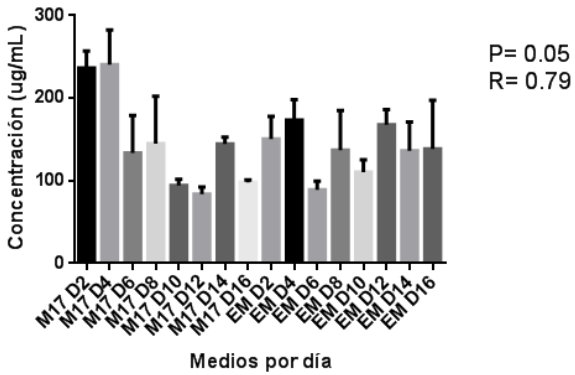
Se analizaron los datos antimicrobianos de *Auricularia americana* y fueron no considerados antimicrobianos, pero si resultaron ser buenos bacteriostáticos, pues impidieron el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En la sig. Imagen se muestra los porcentajes de inhibición en los diferentes tratamientos.

### Porcentajes de inhibición de *A. americana* crecida en diferentes medios

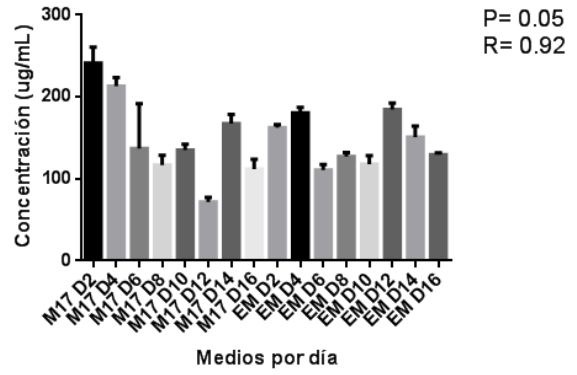


Los compuestos fenólicos totales en los sobrenadantes fueron en general mayores en el medio M17 a las dos mediciones de absorbancia 725 y 765nm. En estas figuras muestran los datos estadísticos donde no existe significativas entre los diferentes medios.

**One-way ANOVA para total de Fenoles (725nm)**

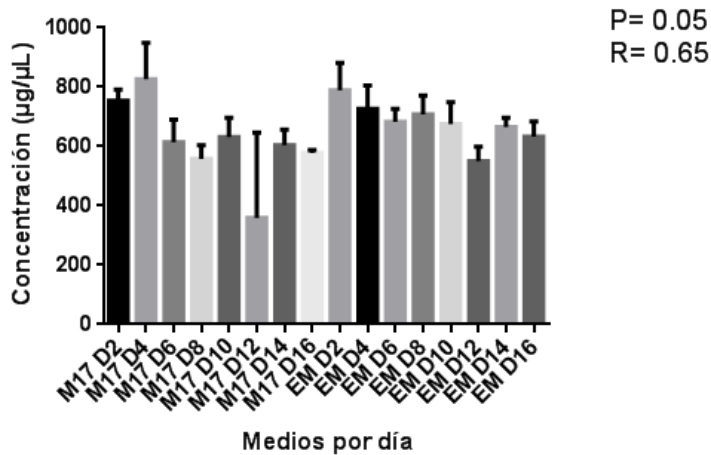


**One-way ANOVA para total de Fenoles (765nm)**



En la Figura se observa los sobrenadantes de los cultivos de *A. americana* donde se muestran los datos estadísticos donde no hay diferencias significativas. Hubo mayor producción de  $\beta$ -glucanos más en el medio EM con una concentración de 788.97 ug/mL.

**One-way ANOVA para B-glucanos**







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de A  
por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 27 de septiembre de 2023

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **ROMÁN MATA SARAI**, con el título del trabajo: **Obtención de la cepa de *Auricularia americana* y su evaluación en la producción de moléculas antimicrobianas, antioxidantes y  $\beta$ -glucanos.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**

*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: M EN C I A I R A PATRICIA I I N A G A R C Í A

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. IBETH RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: BIÓL. ZURIEL GONZÁLEZ CARRERA

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN

### Sello electrónico

**IBETH RODRIGUEZ GUTIÉRREZ** | Fecha:2023-09-27 13:16:46 | Firmante

GpSmI9vP3GUskir/ZFMx37l0kzWkNm3XZyeOqJHDdaRmdY0d2sGzTI7mz6Fn6d9cppRLIHfluAU0VIP8BM3XzI7Z7ZkQcGS6pu0+BbhhSr0QYwk8Af3A4SpgjF32bN6nes7jEjhoqFtJbOvJq3j20cX62Lv/5YdSGWaV0XJDbF6WUv5XKbfqAfBWsLuXNY3ddxdGXNjWELFW0P79XUN/sxBVDDdKSeznfRL0ZZ07atxfIs9Rr6eJWWt2BLP5YTrPr6b+4p5i9VjeH4ct8kSkug6aBeM9E7NroiWz+7vmAU7G4I+d+HOO65FjVzeTZ0pt9zFWDAqDqL6JWOW

**MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA** | Fecha:2023-09-28 16:32:04 | Firmante

KqGF6fCW/rov1EkhVWox3WcWCLTK8VdTmPie2YgDnwvV31uqggopif/aRmQfWDAqOiy1CtELsYJo7jxpxU8/Zg+SCyYCI0Z5k8ISDCR4HFBOhhWQJVj8AjYZa8cH4DtisgN71p q6n5WFNmljezYCKbzOUUnjDK97KBeMJGoRoJKIgpE1FsGHOFkbBWOfJ/hzUbjou+sr7KM7aMe5T3LezoR1enKF6/Nsh15rP9Ov5YViz0HURwrYgoye1LomYLEzbovyGReapQDyt FJ3McdgQ6TuuwpHE1eOit/DV/8tyh8ZWmAru8tuy4yMC+GxhEXKEHB4GC6yVZO2jwQvdbA

**ZURIEL GONZALEZ CARRERA** | Fecha:2023-10-02 14:30:50 | Firmante

adn9b+tCLJBjK9902P2cGanPQ1pcZ+0bdhphSGJvhao9ISMW0cG65W23Nz6G+2tMBDrXBYkd3OHRWaQ03VdDwzysmK31/eGW/QeJYR2eyVTvILFfxN2E7HMae0YOpbmM PQV9w1Y1KCNd5eaVUdti4/TnqWKJpHq92Ezswraq9kX/mki0Hfq6wiPQGUEgarYBxwHBuWWGIzSWtj+ngab7uoz2s9NV4d2UR3EoMkYGbuVvhjH9bXQZKsJmb6VDPGusYo eH15PZu2XAcIwZqjsExZ70ymLE0PPEh76gfnT1gDcZWdKdKH2YNx3GHDrrB2WBco7Xoi352nrKjFHVcw==

**LAURA PATRICIA LINA GARCIA** | Fecha:2023-10-18 15:03:01 | Firmante

qKEAO9WlusL2ObKbJ8BoerylIpwOJous9NYP+k6z434RIZGR3m/xCzKo5kBEREoNBBPvvdsmI4FVv8mVnqTCV2tyd+Xal/+b9YJ74R7qj/sZB6VjjeGk+/mT8j03+wHCLoYTKHi q5xKW0Tx9enxUhb1knLVPjTSLdCSPEwe+ImIYllgRyAJbumnKHa2qQyvwHPpLx1XgwwwGND9v30KeoVDZVrbrTel7fWjDJ2wXM/xj9c6PgrIS3NngYTptzXTNWONroc4TcNyAh SB5PcQTn+oIECLFM5s/OOVdoH5Xa4Fs5gYB7gU8EY7lcYA5xjosaMexTMkU8fym6aNg==

**EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ** | Fecha:2023-10-20 18:55:41 | Firmante

hmkvaT9YL13D8/qYdzYptxHhz6lHdrcN4tMGk6eOUpvfTDTkd1tD5tm47NAGXsmnznrcY/zUCWvuFT5K+wIZEI+DtafwbER8kpcIO8ZZWLRyHAafEsbu6/x7LNo30k6nDvVQwVI Gf07njgDR9QTJucCej9BitMhU2s1+ugbFUdzo1Mqx8m0AD8+F5WV72inK9e/fM2Rf1860wRALi+vW5tSS4iLpq+tjQ3grq3rPAKUcvKC3Cmblb8ppL1wn9giUjwfiMmjK6i2rkOcsCou Snhk2SGky5YqdS0jdUtU3Mj2JEwjeJGJuRQHoABZ528HPGWDQT+Xcz4tg8dJDDIA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



iAL9Wtedq

<https://efirma.uaem.mx/noReputio/OePRsMyiUhLzJzTdD7w6UaD6MFC34I>

