

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

"Estudio químico y encapsulación de extractos del hongo ancestral
huitlacoche *Ustilago maydis* como potencial nutracéutico"

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
CARLOS AXEL ESPÍNDOLA GOROSTIETA

DIRECTOR: DRA. MAYRA YANETH ANTÚNEZ MOJICA

CODIRECTOR: DRA. AMÉRICA IVETTE BARRERA MOLINA

SINODALES: DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER
DR. MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR
DRA. ZORMY NACARY CORREA PACHECO
DR. DANIEL TAPIA MARURI
DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2024

JURADO

Asignación	Nombre	Adscripción
PRESEIDENTA	Dra. Laura Patricia Alvarez Berber	CIQ-UAEM
SECRETARIO	Dr. Mario Alfonso Murillo Tovar	CIQ-UAEM
VOCAL	Dra. Zormy Nacary Correa Pacheco	CEPROBI-IPN
SUPLENTE	Dr. Daniel Tapia Maruri	CEPROBI-IPN
SUPLENTE	Dra. Maria Luisa del Carmen Garduño Ramírez	CIQ-UAEM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEPROBI - IPN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biomoléculas del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Investigación de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (IICBA-CIQ-UAEM), bajo la dirección de la Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica y codirección de la Dra. América Ivette Barrera Molina, con el apoyo de la beca No. **824915** otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Lugar de realización de tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

La realización de la presente tesis se llevó a cabo en las siguientes instancias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos:

- Centro de Investigaciones Químicas.



- Laboratorio 321

- Dra. Laura Patricia Alvarez Berber
- Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica (Directora de tesis)

- Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM)



- Tec. Ind. Maria Gregoria Medina Pintor
 - CG-MS
 - IR
- Dra. Ma. de los Ángeles Ramírez Cisneros
- Dra. Iris Janet Montoya Balbas
 - HPLC
- Mtra. Victoria Labastida Galván
 - Espectrometría de Masas de Alta Resolución
- Mtra. Cristina Margarita Rodríguez Narváez
 - RMN

- Universidad Autónoma del Estado de Morelos

- Facultad de Nutrición



- Dra. América Ivette Barrera Molina (Codirectora)
 - Microencapsulación
 - Nanoencapsulación

Además, se contó con la colaboración en las siguientes instituciones:

- Universidad Nacional Autónoma de México
 - Instituto de Biotecnología
 - Dr. Raúl Dávila Delgado
 - Dra. Rosana Sánchez López
 - Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



- Instituto Politécnico Nacional
 - Centro Desarrollo de Productos Bióticos
 - Dra. Perla Osorio Díaz
 - Dra. María Antonia Hernández Aguirre
 - Liofilización encapsulados
 - Dra. Zormy Nacary Correa Pacheco
 - Laboratorio de Microscopía Avanzada
 - Dr. Daniel Tapia Maruri
 - Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental
 - Microscopía Confocal de Barrido Laser
 - CINVESTAV-Zacatenco
 - Dr. Jaime Santoyo Salazar
 - Microscopía Electrónica de Transmisión



CEPROBI - IPN



Cinvestav

Listado de presentaciones en congresos del trabajo

❖ Asociación Mexicana de Productos Naturales (AMIPRONAT)

o 18ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales

- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Caracterización y cuantificación de polifenoles en tres extractos de huitlacoche comercializado en el Estado de Morelos



Espíndola-Gorostieta, C., Sánchez-Mendoza, J., Barrera-Molina, A.I., & Antúnez Mojica, M. (2023). Caracterización y cuantificación de polifenoles en tres extractos de huitlacoche comercializado en el Estado de Morelos. *Revista Mexicana de Investigación en Productos Naturales*, 1(1), 232. <https://www.amipronat.org.mx>

❖ Instituto en Ciencias Básicas y Aplicadas - UAEM

o Jornada IICBA

- Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Estudio polifenólico en extractos del hongo *Ustilago Maydis* (huitlacoche) comercializado en el Estado de Morelos.



❖ Asociación Mexicana de Productos Naturales (AMIPRONAT)

o 19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales

- Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Estudio micoquímico de dos extractos etanólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis*) y su microencapsulación



Espíndola-Gorostieta, C., Alvarez-Berber, L., Dávila-Delgado, R., Barrera-Molina, A.I., & Antunez Mojica, M. (2024). Estudio micoquímico de dos extractos etanólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis*) y su microencapsulación. *Revista Mexicana de Investigación en Productos Naturales*, 1(1), 291. <https://www.amipronat.org.mx>

Agradecimientos

Mi especial agradecimiento a la Dra. Mayra Antunez quien una vez más a depositado su confianza para la realización del presente proyecto, su apoyo, orientación y su siempre oportuna participación que han sido invaluable tanto en el desarrollo de esta tesis como en mi formación como investigador.

Esta tesis es también fruto de una codirección, agradezco a la Dra. Ivette Barrera por su constante apoyo para la realización y caracterización de los encapsulados.

De igual forma, debo agradecer a la Dra. Mayra y a la Dra. Ivette por haberme brindado siempre los medios suficientes para llevar en marcha las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Gracias a los miembros de mi comité tutorial (Dra. Sandra Olimpia, Dra. Maria Luisa Garduño) por sus observaciones y orientación que emitían cada en cada semestre para hacer de este un mejor trabajo.

A los miembros del comité revisor (Dra. Laura Alvarez, Dr. Mario Murillo, Dra. Zormy Correa, Dr. Daniel Tapia, Dra. Maria Luisa Garduño) les agradezco sus observaciones que enriquecieron mi manuscrito de tesis.

Mi mayor reconocimiento y agradecimiento a mis padres Mtra. Ma. del Carmen Gorostieta Rodríguez y M. en. C. José Luis Espíndola García que una vez más me enorgullece decir que son el pilar maestro de todo lo que soy. Gracias por ser los principales promotores de mis metas pero sobre todo su apoyo incondicional a lo largo de este camino.

De igual forma, mis hermanos Mtra. Edmee Espíndola e Ing. Dennis Espíndola debo darles las gracias por brindarme esa motivación para continuar en este camino.

A mis mejores amigos el Lic. DMNQ Maximiliano Rojas y Lic. DMNQ Ivan Ortega, les agradezco por estar presente a lo largo de estos años, su apoyo, confianza, motivación y soporte, son invaluable.

Asimismo, agradezco a mi mejor amigo Martynas Dvylaitis por su apoyo y motivación durante la realización de la maestría pero en especial cuando el barco parecía naufragar.

Gracias a la Dra. Araceli Guerrero por su amistad, apoyo y orientación cuando algunas dudas existenciales aparecían en escena para la realización de mi proyecto, de igual forma mi gratitud a Kytzia Alcalá, Mathiu Jiménez, Marlon Espínosa, Melissa González, Pamela Rangel, por brindarme su amistad, confianza y apoyo durante mi periodo de maestría pero sobretodo, gracias por hacer del tiempo en el laboratorio más ameno.

Además agradezco a mis amigos y compañeros de la Facultad de Nutrición (M. en C. Mónica Villanueva, L.N. Narda Aguilar, Antonio Rosales, Sahian Nava, Mónica Jacobo) por brindarme su amistad durante mi estadía en el laboratorio, su asistencia en la elaboración de los encapsulados y en los ensayos.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud a todos los que han estado involucrados tanto directa como indirectamente en el desarrollo de mi investigación, de mi formación universitaria y personal.

Índice

Lugar de realización de tesis	4
Listado de presentaciones en congresos del trabajo	6
Agradecimientos	7
Índice.....	9
Índice de Diagramas.....	13
Índice de Espectros.....	14
Índice de Figuras	15
Índice de Gráficas.....	18
Índice de Tablas.....	19
Abreviaturas.....	21
Resumen.....	25
1. Introducción	27
2. Antecedentes	28
2.1 Nutracéuticos	28
2.2 Hongos.....	28
2.3 Generalidades del Género <i>Ustilago</i>	29
2.4 Generalidades de la Especie <i>Ustilago maydis</i>	30
2.4.1 Ciclo de Vida.....	31
2.4.1 Contenido Nutricional	33
2.4.2 Estudios Químicos	34
2.5 Encapsulación.....	51
2.5.1 Microencapsulación	51
2.5.1.1 Alginato.	52
2.5.1.2 Quitosano.....	54
2.5.1.2 Quitosano-Alginato.....	55
3. Justificación.....	56
4. Hipótesis.....	57
5. Objetivo General.....	57
5.1 Objetivos Particulares.....	57
6. Materiales y Métodos	58
6.1 Obtención del Material Fúngico.....	59
6.2 Obtención del Extracto	59

6.2.1 Huitlacoche Fresco (HF).....	59
6.2.2 Huitlacoche Cocido (HC).....	59
6.3 Bipartición de los Extractos	60
6.4 Cuantificación de Polifenoles Totales	61
6.4.1 Preparación de las Soluciones.....	61
6.5 Técnicas Cromatográficas.....	62
6.5.1 Cromatografía en Columna Abierta	62
6.5.2 Cromatografía en Capa Fina.....	62
6.5.3 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	62
6.5.4 Cromatografía de Gases	63
6.6 Técnicas de Elucidación.....	64
6.6.1 Resonancia Magnética Nuclear.....	64
6.7 Micoquímica	64
6.7.1 Fraccionamiento Primario Fases de DCM	64
6.7.1.1 Huitlacoche Cocido.....	64
6.7.1.2 Huitlacoche Fresco.....	65
6.7.2 Fraccionamiento Secundario de las Fases de DCM.....	67
6.5.2.1 Huitlacoche Cocido: Reunión A05.....	67
6.5.2.1 Huitlacoche Fresco: Reunión Q02.....	68
6.5.2.1 Huitlacoche Fresco: Reunión Q09.....	68
6.8 Microencapsulación de Extractos	69
6.8.1 Alginato de Sodio.....	69
6.8.1.1 Preparación de las Soluciones.....	69
6.8.1.2 Desarrollo del Método.....	69
6.8.2 Quitosano.....	70
6.8.2.1 Preparación de las Soluciones.....	70
6.8.2.2 Desarrollo del Método.....	70
6.8.3 Quitosano-Alginato-Extractos Etanólicos Huitlacoche	71
6.8.3.1 Preparación de las Soluciones.....	71
6.8.3.2 Desarrollo del Método.....	71
6.9 Microscopia Estereoscópica.....	73
6.10 Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM)	73
6.11 Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)	73

6.12 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	74
6.13 Análisis de Imágenes Estáticas de Microscopía y Estereoscopia	74
6.14 Análisis estático ANOVA	74
7. Resultados y Discusión.....	75
7.1 Rendimientos de Extractos y Fases de Bipartición	75
7.2 Análisis Químico de los Extractos Etanólicos de Huitlacoche.....	78
7.2.1 Cuantificación de Polifenoles Totales.....	78
7.2.2 Detección de Polifenoles Mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia.....	80
7.3 Análisis Químico de las Fases Obtenidas Mediante Bipartición	82
7.3.1 Identificación de Metabolitos de la Fases Hexánicas	82
7.3.2 Identificación de Compuestos en la Fases de Diclorometano.....	86
7.3.2.1 Análisis del Perfil Micoquímico de las Fases de DCM por CG-EM.	86
7.3.2.2 Identificación de Compuestos Polifenólicos en la Fase de DCM.....	90
7.3.2.3 Perfil Químico de la Fase de DCM Basado en RMN.....	92
7.3.2.4 Purificación de las Fases de DCM Mediante Cromatografía en Columna.	93
7.3.2.4.1 Identificación de Compuestos por CG-EM de la Reunión A05 y Q09	99
7.3.3 Identificación de compuestos en las fases Hidroalcohólicas.....	102
7.3.3.1 Análisis por CLAE de Polifenoles en las Fases Hidroalcohólicas.....	102
7.4 Caracterización de Compuestos Aislados	104
7.4.1 Caracterización de 6-Metoxi-2-Benzoxazolinona (Coixol)	104
7.4.2 Caracterización del Ácido 4-Hidroxibenzoico	109
7.5 Análisis y Caracterización de Encapsulados.....	114
7.5.1 Microcápsulas de Alginato de Sodio.....	114
7.5.1.1 Caracterización Morfológica Mediante Microscopia Óptica.....	116
7.5.1.2 Determinación de Tamaño Mediante Microscopia Estereoscópica....	118
7.5.2 Microcápsulas de Quitosano	124
7.5.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido.	124
7.5.2.2 Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM).....	126
7.5.3 Nanocápsulas de Quitosano	129
7.5.3.1 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).	129
7.5.3 Microcápsulas de Alginato - Quitosano.....	130

7.5.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido	130
7.5.2.2 Microscopía confocal de barrido láser (CLSM).....	132
8.Conclusiones	138
9.Perspectivas.....	139
10. ANEXOS.....	140
10.1 Tiempos de Retención de los Estándares de Polifenoles	140
10.2 Espectros de UV: Estándares	141
10.3 CG-EM Reunión A01	142
10.4 CG-EM Reunión A02.....	143
10.5 CG-EM Reunión Q01.....	144
10.6 CG-EM Reunión A-R05	145
10.7 CG-EM Reunión Q-V01	146
10.8 CG-EM Reunión Q-S04.....	147
10.9 Diagramas de Flujo Encapsulación.....	148
10.10 CLSM.....	149
Referencias	150

Índice de Diagramas

Diagrama 1. Metodología general del proyecto.....	58
Diagrama 2. Condiciones de bipartición para los extractos etanólicos de huitlacoche. ...	60
Diagrama 3. Reuniones del fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la fase de DCM extracto etanólico de huitlacoche cocido.....	95
Diagrama 4. Reuniones del fraccionamiento primario del extracto etanólico de huitlacoche cocido.....	97
Diagrama 5. Diagramas de flujo de micro y nanoencapsulación	148

Índice de Espectros

Espectro 1. Espectro ^1H -RMN, 500 MHz, CD ₃ OD-MeOD; fase DCM huitlacoche a) fresco, b) cocido.	92
Espectro 2. ^1H RMN (600 MHz, Metanol-d ₄) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.....	104
Espectro 3. ^{13}C RMN (150 MHz, Metanol-d ₄) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.	104
Espectro 4. HSQC RMN (600 MHz, Metanol-d ₄) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.....	105
Espectro 5. HMBC RMN (600 MHz, Metanol-d ₄) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.....	106
Espectro 6. Espectrometría de masas de alta resolución del MBOA.	108
Espectro 7. ^1H RMN (600 MHz, Metanol-d ₄) del ácido 4-hidroxibenzoico.	110
Espectro 8. ^{13}C RMN (150 MHz, Metanol-d ₄) del ácido 4-hidroxibenzoico.....	110
Espectro 9. HSQC RMN (600 MHz, Metanol-d ₄) del ácido 4-hidroxibenzoico.....	111
Espectro 10. HMBC RMN (600 MHz, Metanol-d ₄) del ácido 4-hidroxibenzoico.	112
Espectro 11. COSY RMN (600 MHz, Metanol-d ₄) del ácido 4-hidroxibenzoico.....	112
Espectro 12. UV-Vis de los estándares de polifenoles analizados por HPLC.....	141

Índice de Figuras

Figura 1. Relaciones filogenéticas entre 2 subfilos de Basidiomycota y entre taxones en Ustilaginomycetes de Ustilaginomycotina, tomado y modificado de (Boekhout et al., 2011)	29
Figura 2. Diferentes nombres del <i>U. maydis</i> (huitlacoche) en distintos dialectos de México.	30
Figura 3. Ciclo del <i>U. maydis</i> , tomado de (Seville et al., 2012).	32
Figura 4. Morfologías de los microencapsulados, tomado y modificado de (Agnihotri et al., 2012)	52
Figura 5. Estructura de cadena de alginato, tomado y modificado de (Martau et al., 2019)	52
Figura 6. Estructura de caja de huevo producida por alginato	53
Figura 7. Estructura del quitosano	54
Figura 8. Interacción entrecruzamiento de quitosano-alginato, tomado y modificado de (Feyissa et al., 2023)	55
Figura 9. Materia prima de huitlacoche	59
Figura 10. Placas de CCF: a) Extractos etanólicos, b) Fases hexánicas, c) fases de DCM, d) fases hidroalcohólicas.....	77
Figura 11. Cromatogramas a $\lambda = 270$ nm del extracto etanólico de a) huitlacoche fresco y b) Huitlacoche Cocido.	80
Figura 12. Cromatogramas de las fases de hexano del extracto etanólico del a)huitlacoche cocido y b) huitlacoche fresco	82
Figura 13. Cromatogramas de las fases hexánicas del extracto etanólico del a)huitlacoche cocido y b) huitlacoche fresco.	86
Figura 14. Cromatogramas a $\lambda = 270$ nm de la fase de DCM del extracto etanólico de a) huitlacoche cocido y b) Huitlacoche fresco	90
Figura 15. Placas de CCF de las reuniones del fraccionamiento de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche cocido vistas en onda corta y larga.....	93
Figura 16. a) Sólido blanco de la reunión $\Lambda 03$, b) Sólido pastoso de la reunión Λ -R03 c) placa CCF comparativa de la fase de DCM del huitlacoche cocido (H.C.), reunión ($\Lambda 03$), reunión (Λ -R03), ácido 4-hidroxibenzoico (4-hb), ácido p-cumárico (p-c), Ácido vainillico (V)	94
Figura 17. Placa CCF reuniones fraccionamiento $\Lambda 05$	94
Figura 18. Placas de CCF de las reuniones del fraccionamiento de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche fresco vistas en onda corta y larga.	96
Figura 19. Placa comparativa de CCF del compuesto obtenido en el fraccionamiento de las fases de DCM de ambos extractos.	96
Figura 20. Placa CCF reuniones fraccionamiento Q02 en un sistema hexano: AcOEt: Ác. Fórmico (6:4:0.1)	98
Figura 21. Placa CCF reuniones fraccionamiento Q09 en un sistema hexano: AcOEt: Ác. Fórmico (6:4:0.1).	98
Figura 22. Cromatograma de la reunión $\Lambda 05$ y reunión Q09	99

Figura 23. Cromatogramas a $\lambda = 270$ nm de la fase hidroalcohólica del extracto etanólico de a) huitlacoche fresco y b) Huitlacoche Cocido.....	103
Figura 24. CG-EM del 6-Metoxi-2-benzoxazolinona.....	107
Figura 25. Cromatograma de gases de la reunión Q04 (superior) y cromatograma de masas del ácido 4-hidroxibenzoico (inferior)	109
Figura 26. Cápsulas de alginato a una concentración de a) 1%, b) 1.5 %, c) 2%	114
Figura 27. Cápsulas de alginato-extracto de huitlacoche.....	115
Figura 28. Tomas de microscopía óptica de las microcápsulas de alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche cocido y alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche fresco a distintas concentraciones de extracto (1%, 1.8%, 2.5%) y alginato de sodio (1%, 1.5%,2%); magnificación de 10x.....	117
Figura 29. Tomas de microscopía estereoscópica de las microcápsulas de alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche cocido y alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche fresco a distintas concentraciones de extracto (1%, 1.8%, 2.5%) y alginato de sodio (1%, 1.5%,2%); magnificación de 10x, enfoque 0.63	119
Figura 30. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de microcápsulas de a) Quitosano – Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (ΛF) (0.01%-2.5%), b) Quitosano – Extracto Etanólico de Huitlacoche Cocido (βC) (0.01%-2.5%); a una magnificación de 200x y 500x y una barra de escala de 20 μm	125
Figura 31. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Quitosano-E.E.H.C (ΛC) 0.01%:1.8%, b) Quitosano-E.E.H.F. (ΛF) 0.01%:1.8%; mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μm	127
Figura 32. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Quitosano-E.E.H.C (βC) 0.05%:1.8%, b) Quitosano-E.E.H.F. (βF) 0.05%:1.8%; mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μm	128
Figura 33. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) de los nanocapsulados de a) Quitosano-E.E.H.C (βC) 0.05%:1.8%, b) Quitosano-E.E.H.F (βF) 0.05%:1.8%, con una barra de escala de 100 μm	129
Figura 34. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de microcápsulas de a) Alginato de sodio-quitosano-extracto (0.01:1.5:1.8) ΛQF , b) Alginato de sodio-quitosano-extracto (0.01:2.5:1.8) ΛSF ; a una magnificación de 200x y 500x y una barra de escala de 10 y 20 μm	131
Figura 35 Micrografías de microscopía confocal de los encapsulados de a) Qtn/A.S./E.E.H.C (0.01-1.8.) y b) quitosano-E.E.H.F.....	132
Figura 36. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Quitosano-A.S.-E.E.H.C (ΛQC) 0.01%:1.5%:1.8% b) Quitosano-A.S.-E.E.H.C (ΛSC) 0.01%:2.5%:1.8%, c) Quitosano-A.S.-E.E.H.F (ΛSF), 0.01%:2.5%:1.8%, mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5	

% de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μ m.....	134
Figura 37. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Quitosano-A.S.-E.E.H.C (β QC) 0.05%:1.5%:1.8% b) Quitosano-A.S.-E.E.H.C (β SC) 0.05%:2.5%:1.8%, c) Quitosano-A.S.-E.E.H.F (β QF), 0.05%:1.5%:1.8%, mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μ m.....	136
Figura 38. Cromatograma de gases de la reunión Λ 01.....	142
Figura 39. Cromatograma de gases de la reunión Λ 02.....	143
Figura 40. Cromatograma de gases de la reunión Q1.....	144
Figura 41. Cromatograma de gases de la reunión Λ -R05.....	145
Figura 42. Cromatograma de gases de la reunión Q-V01	146
Figura 43. Cromatograma de gases de la reunión Q-S04	147
Figura 44. Sobreposicionamiento de micrografías de microscopía confocal de barrido láser a λ = 405 nm a 488 nm 640 nm.....	149

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Curva de calibración de ácido gálico para el ensayo de Folin-Ciocalteu.	78
Gráfica 2. Comparación de polifenoles totales para Extracto etanólico y metanólico de huitlacoche cocido y fresco	79
Gráfica 3. Ácidos grasos más abundantes en la fase hexánica de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.	84
Gráfica 4. Micoesteroles más abundantes en la fase de DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.	85
Gráfica 5. Metabolitos más abundantes en la fase de DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.	88
Gráfica 6. Carbohidratos más abundantes en la fase de DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.	89
Gráfica 7. Metabolitos mayoritarios para la reunión A05 del huitlacoche cocido y Q09 del huitlacoche fresco	101
Gráfica 8 Tamaños de las microcápsulas a diferentes concentraciones de A.S.- E.E.H..	121
Gráfica 9. Comparativa de tamaños de microcápsulas a diferentes concentraciones de CaCl_2 y alginato	123
Gráfica 10. Tiempo de retención de los estándares empleados para HPLC.	140

Índice de Tablas

Tabla 1. Contenido nutricional del huitlacoche, por (Aydoğdu & Gölükçü, 2017)	33
Tabla 2. <i>Contenido nutricional del huitlacoche acorde al sistema mexicano de alimentos equivalentes</i>	33
Tabla 3. <i>Metabolitos reportados en la literatura para el hongo Ustilago maydis (huitlacoche)</i>	34
Tabla 4. <i>Contenido de polifenoles totales reportado para huitlacoche en la literatura</i>	50
Tabla 5. Métodos de microencapsulación de alimentos, modificado de (Jafari, 2017).....	51
Tabla 6. <i>Condiciones de operación de HPLC</i>	63
Tabla 7. Condiciones de operación para cromatografía de gases	63
Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de la fase de DCM del extracto de huitlacoche cocido.....	64
Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico fase de DCM del extracto de huitlacoche fresco.	66
Tabla 10. Fraccionamiento cromatográfico reunión $\Lambda 05$ del extracto de huitlacoche cocido	67
Tabla 11. Fraccionamiento cromatográfico reunión Q02 del extracto de huitlacoche fresco.	68
Tabla 12. Fraccionamiento cromatográfico reunión Q09 del extracto de huitlacoche fresco	68
Tabla 13. Formulaciones para los encapsulados con alginato de sodio	69
Tabla 14. Formulaciones para los encapsulados con quitosano	71
Tabla 15. Formulaciones para los encapsulados con quitosano-alginato de sodio.....	72
Tabla 16. Equivalencia de Pixeles/ Unidad por técnica de microscopía	74
Tabla 17. <i>Rendimiento de las fases de los extractos de huitlacoche</i>	75
Tabla 18. Resultados de cuantificación de polifenoles para los extractos etanólicos de huitlacoche.....	78
Tabla 19. <i>Tiempos de retención de los picos detectados a $\lambda=270$ nm para el Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (E.E.H.F.) y Huitlacoche Cocido (E.E.H.C.)</i>	81
Tabla 20. <i>Compuestos presentes en la fase hexánica de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco</i>	83
Tabla 21. <i>Compuestos presentes en la fase DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco</i>	87
Tabla 22. <i>Tiempos de retención de los picos detectados a $\lambda=270$ nm para la fase DCM del Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (E.E.H.F.) y Huitlacoche Cocido (E.E.H.C.)</i>	91
Tabla 23. <i>Resultados de los compuestos detectados a $\lambda=270$ nm y $\lambda=300$ nm para la fase DCM del E.E.H.F. y E.E.H.C. acorde a los estándares de referencia</i>	91
Tabla 24. <i>Compuestos presentes en la reunión $\Lambda 05$ y reunión Q09</i>	100
Tabla 25. <i>Tiempos de retención de los picos detectados a $\lambda=270$ nm para la fase hidroalcohólica del Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (E.E.H.F.) y Huitlacoche Cocido (E.E.H.C.)</i>	102
Tabla 26. Resultados RMN 1D y 2D de 6-Metoxi-2-benzoxazolinona (coixol).	106
Tabla 27. <i>Resultados RMN 1D y 2D del ácido 4-hidroxibenzoico.</i>	113

Tabla 28. Resultados del estudio de análisis de varianza unidireccional ANOVA.....	120
Tabla 29. Tamaño de los microencapsulados de los extractos de huitlacoche.	122
Tabla 30. <i>Compuestos presentes en la reunión $\Lambda 01$</i>	142
Tabla 31. <i>Compuestos presentes con porcentaje mayor a 1% en la reunión $\Lambda 02$</i>	143
Tabla 32. Compuestos presentes con porcentaje mayor a 1% en la reunión Q01	144
Tabla 33. <i>Compuestos presentes en la reunión $\Lambda -R05$</i>	145
Tabla 34. <i>Compuestos presentes en la reunión Q-V01</i>	146
Tabla 35. Compuestos presentes en la reunión Q-S04.....	147

Abreviaturas

μ

μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
°C	Centígrados

A

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
Ác.	Ácido
A.S.	Alginato de sodio
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>

C

CaCl ₂	Cloruro de calcio
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CF	Cloroformo
CG	Cromatografía de Gases
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
cm	Centímetro(s)
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>

D

DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>

E

EAG	Equivalente de Ácido Gálico
E.E.H.	Extracto Etanólico de Huitlacoche
E.E.H.C.	Extracto Etanólico de Huitlacoche Cocido
E.E.H.F.	Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco
EtOH	Etanol
Et ₂ O	Diethyl eter
Eq	Equivalente

F

FAB	<i>Fast atom bombardment</i>
-----	------------------------------

G

g	Gramo
---	-------

H

h	Hora
H ₂ O	Agua
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>

I

IR	Infrarrojo
----	------------

K

Kg	Kilogramos
----	------------

L

l	Litro
---	-------

M

mBar	MiliBar
MBOA	6-Metoxi-2-benzoxazolinona
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
Ms	Masas
MSD	<i>Mass Selective Detector</i>
mL	Mililitro
MHz	MegaHertz
mg	Miligramo
m/z	Masa/carga

N

NaHCO ₃	Carbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>

P

pH	Potencial de hidrógeno
p/v	Peso/Volumen

R

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto

T

t _R	Tiempo de retención
----------------	---------------------

U

U. *Ustilago*

Uv Ultravioleta

V

v/v Volumen/Volumen

V.A.S. Vehículos de Alginato de Sodio

Resumen

Los hongos son un recurso alimentario importante y que a lo largo del mundo han sido integrados en la dieta de las personas, en el caso de México su riqueza biológica le ha permitido el aprovechamiento de sus recursos como lo es el huitlacoche (*Ustilago maydis*).

Este hongo tiene beneficios a la salud del ser humano por el alto contenido nutricional que posee, tales como minerales, vitaminas, ácidos grasos, carbohidratos prebióticos y metabolitos secundarios.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como fin el aislamiento y elucidación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico del huitlacoche cocido y huitlacoche fresco, la identificación y cuantificación de polifenoles, y el encapsulamiento de los extractos usando biopolímeros (quitosano, alginato de sodio, quitosano-alginato de sodio).

El huitlacoche se adquirió en un mercado local de la ciudad de Cuautla, Morelos; posteriormente, se realizó la maceración en etanol del huitlacoche en fresco y del huitlacoche después de su tratamiento térmico.

La determinación de polifenoles totales, se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, encontrándose que el extracto de huitlacoche fresco ($10.18 \frac{mgEqA.G.}{g}$) es el que presentó mayor abundancia de metabolitos respecto al huitlacoche cocido ($08.38 \frac{mgEqA.G.}{g}$).

Los extractos de huitlacoche en fresco y cocido se llevaron a bipartición empleando solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y agua), sometiendo las fases de diclorometano a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta, logrando así el aislamiento y elucidación del 6-metoxi-2-benzoxazolinona (coixol) y al ácido 4-hidroxibenzoico, cuyas actividades biológicas reportadas incluyen poseer actividad antioxidante y eliminar los radicales libres.

Además de estos compuestos activos, se logró identificar mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas 4 polifenoles, dos ácidos benzoicos (ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico) y dos ácidos cinámicos (ácido p-cumárico, ácido ferúlico), ácidos grasos esterificados (etil linoleato, etil palmitato, oleato de etilo) y esteroides (espinasterona, γ -sitostenona).

Dentro de la microencapsulación de los extractos, las concentraciones favorables propuestas es de 1.5% de alginato de sodio, en su contraparte, la concentración para aquellos donde se empleó quitosano es de 0.05%.

Este trabajo contribuye al estudio micoquímico del *Ustilago maydis*, así mismo, por primera vez se llevó a cabo la micro y nanoencapsulación de los extractos etanólicos de huitlacoche. De este modo se enriquece su reconocimiento como posible alimento funcional del alto impacto en la dieta y salud humana.

1. Introducción

Ustilago maydis (*U. maydis*) es un hongo (basidiomiceto) que infecta al maíz (*Zea mays*), principalmente la planta joven, lo que genera malformaciones, inicialmente de color gris pálido, pero a medida que madura adquiere el color negro que lo caracteriza. A pesar de esto, en México se ha venido empleando como parte de la dieta culinaria desde la época de las antiguas civilizaciones mexicanas; su nombre popular, huitlacoche o cuitlacoche proviene del vocablo náhuatl (lengua de los mexicas o aztecas) “cuitlacochin” o “cuitlacuchtlí” que significa “maíz en mazorca degenerado” (Juárez-Montiel et al., 2011), en otras latitudes se le refiere también como carbón del maíz.

En cuanto a su contenido nutricional incluye: a) ácidos grasos esenciales (oleico y linoleico que son fuentes de Ω -3 y Ω -6 respectivamente), b) aminoácidos esenciales, c) azúcares de fácil digestión d) fibra, y e) vitamina C y minerales. Así mismo, algunas propiedades terapéuticas que se han estudiado para el huitlacoche han sido hipocolesterolemiantes, inmunomodulador, anticancerígeno, antiinflamatorio, antimicrobiano, antihipertensivo, (Valdez-Morales et al., 2010; Valverde et al., 2015). Aunado a esto, acorde a lo publicado por (Valdez-Morales et al., 2010), el huitlacoche posee una capacidad antimutagénica (41.0 a 76.0%), además de su posible alternativa como antidiabético (Salazar López, 2013) y actividad antioxidante (alrededor de $5151.37 \pm 48.2 \frac{\mu\text{mol trolox}}{100\text{ g}}$). En cuanto a la fitoquímica de este hongo, se han reportado polifenoles totales de $(661.45 \pm 20.56 \frac{\text{mgGAE}}{100\text{ g}})$ (Aydoğdu & Gölükçü, 2017M. L. López & Baeza, 2018).

Por otro lado, los nutraceuticos son productos presentados como una alternativa farmacéutica, ya sea en forma concentrada o ser adicionado a un alimento natural para incrementar las propiedades funcionales en beneficio de la salud (Luengo-Fernández 2007).

Con base a lo expuesto, el presente proyecto tiene como objetivo conocer el contenido de metabolitos secundarios de extractos metanólicos, en particular polifenoles, para su encapsulación y su futura evaluación como potencial nutraceutico.

2. Antecedentes

2.1 Nutracéuticos

Hoy en día podemos apreciar el interés por un estilo de vida saludable para mejorar la calidad de vida de la persona tratando de prevenir o disminuir el riesgo de padecer una enfermedad adoptando el consumo de productos naturales, dando pie a un área de investigación relevante del papel de los compuestos activos de estos productos, (Nath, 2018)

Dentro de esto se encuentra un concepto denominado nutracéutico, que fue acuñado en 1989 por Stephen De Felice, definiéndolo como un alimento o partes de este que proporcionan beneficios a la salud, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades, (Kumar, 2018).

Dicho término se emplea para describir un grupo de alimentos que se encuentra en una brecha en la que son más que alimentos, pero menos que productos farmacéuticos, los cuales proporcionan beneficios adicionales a la salud, junto con el valor nutricional básico del alimento, que derivan de metabolitos secundarios provenientes de las plantas u hongos comestibles generados a través de diversas rutas metabólicas.

Dentro de estos alimentos, encontramos a los hongos como resultado de su alto contenido en proteínas de calidad que contienen una alta proporción de ácidos grasos insaturados como forma vegetal. Los hongos también son una fuente de fibra, particularmente la fibra soluble, el glucano. Los cuerpos fructíferos de los hongos se componen del 50 al 60% de carbohidratos en peso seco, con azúcares libres que representan el 11%.

2.2 Hongos

El planeta tierra es un ingente hontanar de vida con una diversidad de seres vivos, los cuales son divididos en 5 reinos dentro de los cuales se encuentra el reino fungí que se estima comprende entre 1.5 y 7.1 millones de especies (Dornburg et al., 2017), y está compuesto por siete “filos”: Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota y Microsporidia. Este reino comprende desde levaduras unicelulares hasta hongos filamentosos multicelulares que incluye hongos macroscópicos que forman grandes cuerpos fructíferos. A pesar de la cifra de especies, el total estimado de diversidad de hongos disponible para la ciencia es muy inferior, (Kaliyaperumal et al., 2018)

Hay que destacar que estos han sido reconocidos como un vasto venero de principios bioactivos con actividad biológicas como antioxidante (Matuszewska et al., 2018; Shaffique et al., 2021), anticancerígena,(Jeitler et al., 2020; Panda et al., 2022; H. J. Park, 2022), antimicrobiana (Matuszewska et al., 2018), entre otros.

Podemos mencionar que, desde la antigüedad, los hongos han sido una parte importante de la dieta humana. Los griegos creían que los hongos proporcionaban fuerza durante la batalla y, según los chinos, se consideraba un alimento saludable o "Elixir de la vida", (Chatterjee et al., 2021) estas referencias demuestran que la gran mayoría de hongos son benéficos para la salud humana además de su actividad biológica sino también por su extenso contenido nutricional, considerándose como nutraceuticos (Al-Obaidi et al., 2021; Rahi & Malik, 2016)

2.3 Generalidades del Género *Ustilago*

En la familia Ustilaginaceae encontramos al género *Ustilago*, del cual incluye 300 especies, (Boekhout et al., 2011). En la Figura 1 se presenta un árbol filogenético de Basidiomycota.

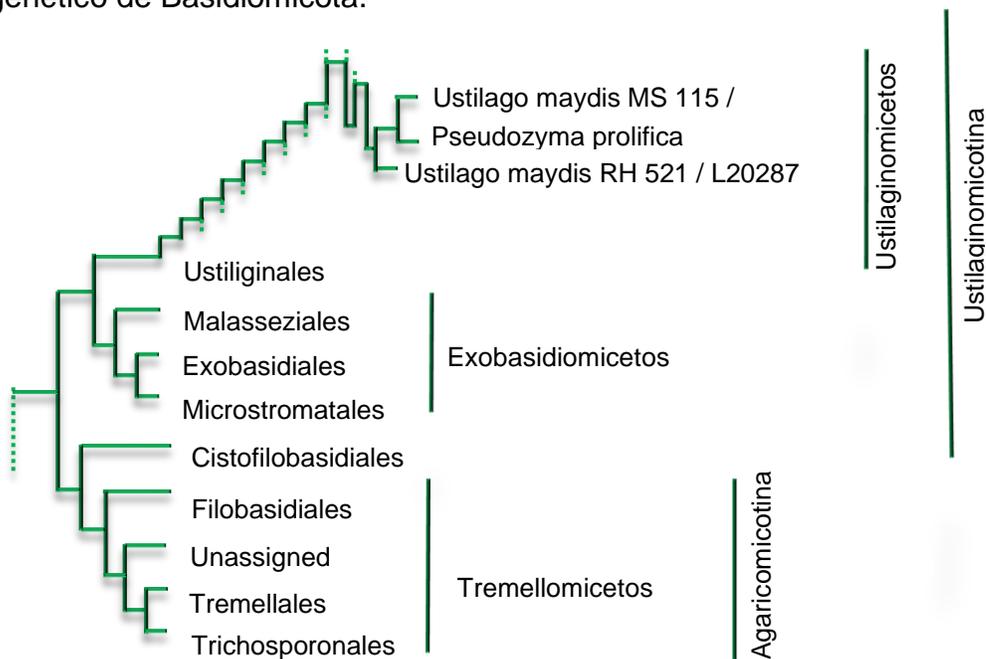


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre 2 subfilos de Basidiomycota y entre taxones en Ustilaginomycetes de Ustilaginomycotina, tomado y modificado de (Boekhout et al., 2011)

2.4 Generalidades de la Especie *Ustilago maydis*

Ustilago maydis (*U. maydis*) es una especie perteneciente al género *Ustilago*, el cual es un patógeno que infecta al maíz produciendo un hongo particular denominado en México como huitlacoche o cuitlacoche. La particularidad de esta especie es que a diferencia de otros Ustilaginales responsables de epifitas severas, son escasas derivando en una afectación menor en plantíos de maíz del cual se registró una producción de 27 millones 503 mil toneladas alcanzadas el ciclo agrícola 2021 acorde a los datos de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER)

Es pertinente mencionar que a lo largo de la República Mexicana al *U. maydis* se le conoce bajo distintos nombres acorde al dialecto de cada región (Santiago et al., 2016) y (Valadez Azúa et al., 2011), (Quinonez-Martinez et al., 2014) ver Figura 2.

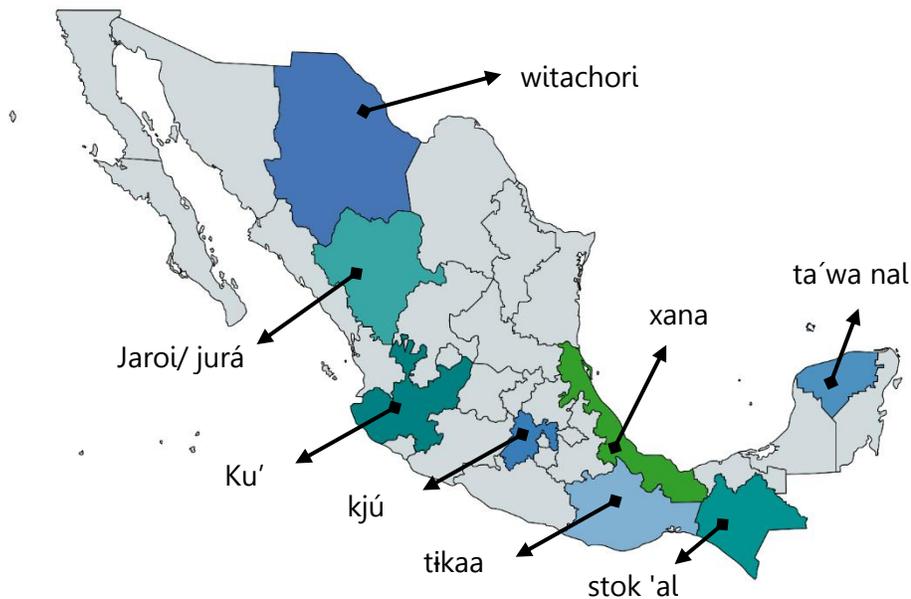


Figura 2. Diferentes nombres del *U. maydis* (huitlacoche) en distintos dialectos de México.

El huitlacoche ha sido empleado como un hongo medicinal en algunas regiones de México como se indica en el libro “Cuitlacoche: El huitlacoche” (Valadez Azúa et al., 2011) ya sea en presentación de té para tratar la diarrea, cólicos o el uso de sus ustilosporas mezcladas con aceite se usan como medicamento para suavizar y calmar la irritación, (Guzmán, 2008; Wołtzczańska, 2018).

Por otro lado, la taxonomía del huitlacoche se describe a continuación, de acuerdo con los Datos del Inventaire National du Patrimoine Naturel:

Clasificación jerárquica

- Dominio: Biota
- Reinado: Fungi
- Sub-reinado: Dikarya Hibbett
- Filo: Basidiomycota
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Ustilago* (Pers.)
- Especie: *Ustilago maydis* (DC.)

2.4.1 Ciclo de Vida

De acuerdo con el libro “El huitlacoche, alimento prehispánico vigente en México. Historia, aprovechamiento y técnicas de producción” de (Salazar-Torres et al., 2021) menciona que el *Ustilago maydis* es un hongo biotrófico dimórfico, por lo que su ciclo de vida se desarrolla en dos fases: saprofítica y micelial-patogénica. En la Figura 3 se ilustra el ciclo de vida de este hongo.

Su ciclo comienza con las teliosporas que en el periodo de germinación forman un tubo germinal, hacia el cual migra el núcleo diploide; el tubo crece formando un promicelio y el núcleo se divide por meiosis para dar origen a cuatro núcleos haploides. Posterior a que en el promicelio se forman tres septos, se desarrollan cuatro basidiosporas uninucleadas y haploides por gemación.

Estas son diseminadas por el viento y la lluvia, comenzando así el desarrollo patogénico en la epidermis de la hoja cuando dos esporidios o basidiosporas compatibles se reconocen entre sí, formándose un micelio dicarionte (filamento infectivo), esta estructura explora la superficie del maíz hasta encontrar aberturas naturales o puede penetrar también la epidermis.

Durante el proceso de infección, forma apresorios encargados de la penetración y colonización; estos se multiplican dentro y entre las células vegetales induciéndoles hiperplasia e hipertrofia, lo cual provoca la formación de una tumoración, asimismo el hongo produce una cubierta protectora (peridio) para evitar la deshidratación del micelio dicariótico.

En un inicio las agallas suelen presentar una coloración blanquecina donde en ellas se forman las teliosporas que conforme maduran adquieren una coloración grisácea-negra, por último, el tejido de las agallas se vuelve frágil sufriendo una ruptura y provocando la liberación de las esporas.

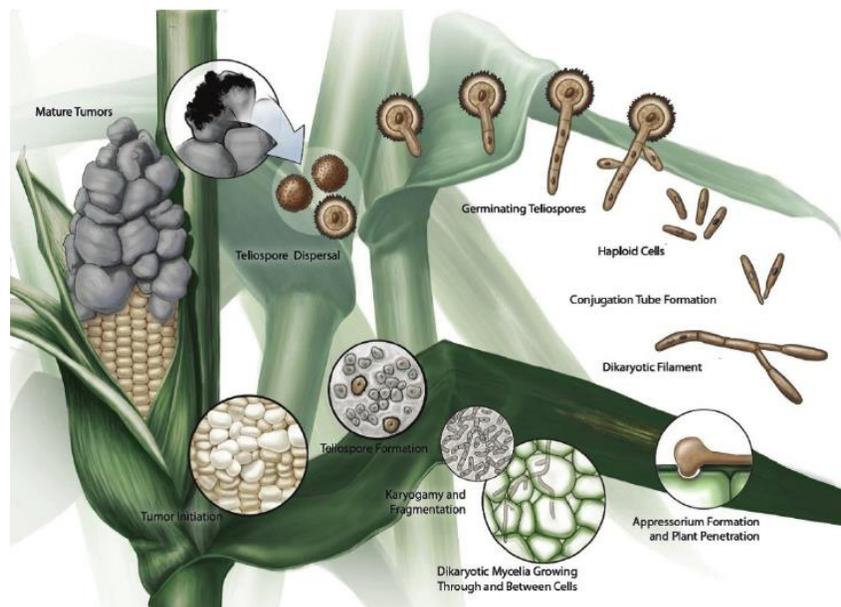


Figura 3. Ciclo del *U. maydis*, tomado de (Seville et al., 2012).

2.4.1 Contenido Nutricional

Acorde al estudio realizado por (Aydoğdu & Gölükçü, 2017) en los valores nutricionales de *Ustilago maydis* podemos encontrar un amplio espectro de nutrientes ya sea minerales o ácidos grasos, ver Tabla 1.

Tabla 1. *Contenido nutricional del huitlacoche, por (Aydoğdu & Gölükçü, 2017)*

Ácidos grasos		Minerales	
	Contenido [mg/kg]		Contenido [mg/kg]
Ácido oleico	42.49 ± 0.12	Mn	1.91 ± 0.07
Ácido linoleico	26.97 ± 0.18	Zn	2.51 ± 0.06
Ácido palmítico	14.79 ± 0.17	Na	12.06 ± 0.08
11-Eicosenoic ácido	4.39 ± 0.10	Mg	262.69 ± 0.02
	Contenido	Ca	18.61 ± 0.01
	[mg/kg]	P	342.07 ± 0.02
Proteína Cruda	12.0 ± 0.1	Fe	2.85 ± 0.08
Celulosa	11.0 ± 0.14		
Grasa total	1.80 ± 0.02		
Carbohidratos	45.0 ± 0.26		

De igual forma los datos que indica el sistema mexicano de alimentos equivalentes para el huitlacoche cocido, reporta los siguientes datos condensados a continuación:

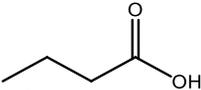
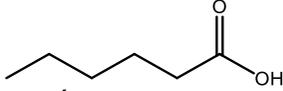
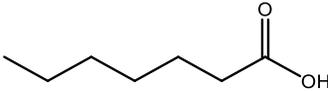
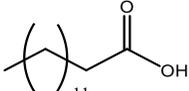
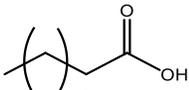
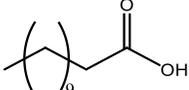
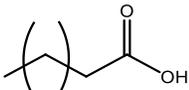
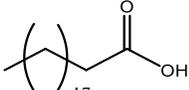
Tabla 2. *Contenido nutricional del huitlacoche acorde al sistema mexicano de alimentos equivalentes*

Proteína (g)	0.8	Vitamina A	0
Lípidos (g)	0.1	Ácido ascórbico (mg)	2.6
Hidratos de carbono (g)	4.1	Hierro NO HEM (mg)	0.3
Fibra (g)	1.2	Potasio (mg)	107.5

2.4.2 Estudios Químicos

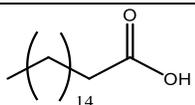
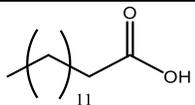
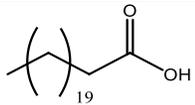
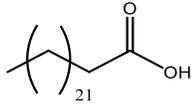
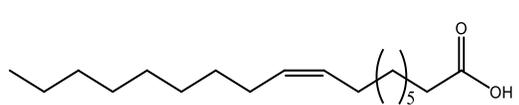
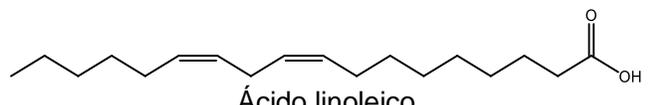
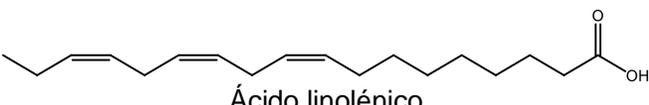
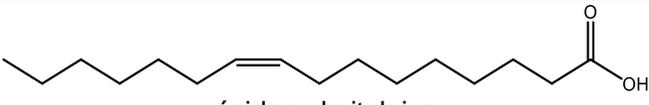
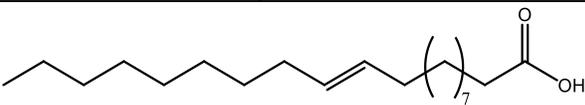
A partir de la literatura se han recopilado algunos metabolitos secundarios presentes en *Ustilago maydis* los cuales se condensan en la siguiente tabla.

Tabla 3. Metabolitos reportados en la literatura para el hongo *Ustilago maydis* (huitlacoche)

Ácidos grasos		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Ácido butírico	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Ácido caproico	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Ácido enántico	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido mirístico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido palmítico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Liofilizado	 Ácido láurico	(Vanegas et al., 1995)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido esteárico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido araquídico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)

[continuación]

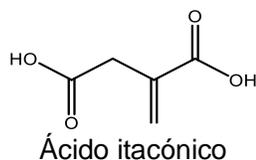
Ácidos grasos

Tratamiento	Metabolito	Referencia
Seco	 14 ácido margárico	(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Seco	 11 Ácido pentadecanoico	(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 19 Ácido bahenico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Liofilizado Extracto MeOH	 21 Ácido Lignocerico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 5 Ácido oleico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido linoleico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido linolénico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado		(Vanegas et al., 1995)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Seco		(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
Soxhlet	 ácido palmitoleico	(Valverde & Paredes-López, 1993)
Seco	 7 Ácido 11-eicosenoico	(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)

[continuación]

Ácidos grasos

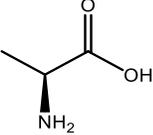
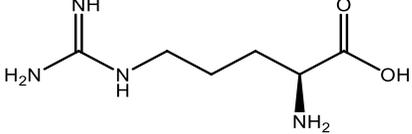
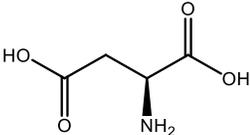
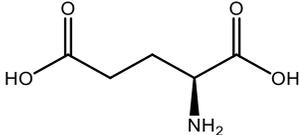
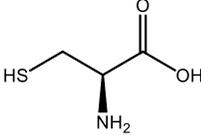
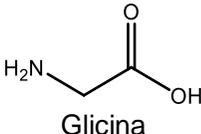
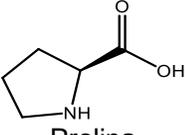
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Fermentación		(Wu et al., 2023)
Cultivo <i>U. maydis</i> MB215		(Becker et al., 2020)
Cultivo <i>U. maydis</i>		(Geiser et al., 2016)
Cultivo <i>U. maydis</i>		(Maassen et al., 2014)
Cultivo <i>U. maydis</i> MB215		(Klement et al., 2012)
Cultivo <i>U. maydis</i>		(Guevarra & Tabuchi, 1990)



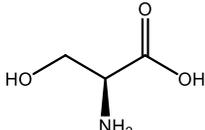
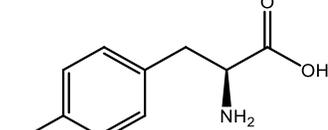
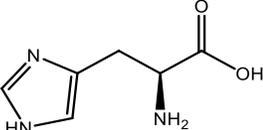
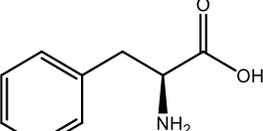
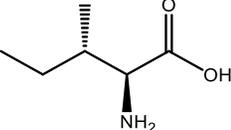
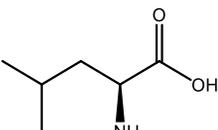
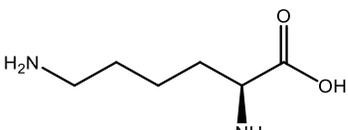
Aldehídos grasos

Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Propanal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Hexanal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Octanal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Nonanal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Decanal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 (E)-oct-2-enal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 (E)-non-2-enal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 (E)-dec-2-enal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 (E)-undec-2-enal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 (E,E)-nona-2,4-dienal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 (E,E)-deca 2,4-dienal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 (E,E)-undeca-2,4-dienal	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)

[continuación]

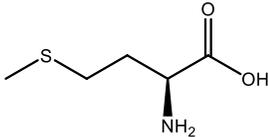
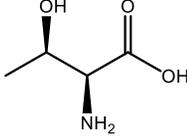
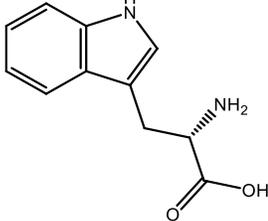
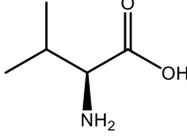
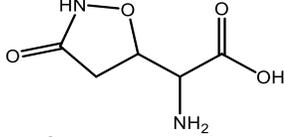
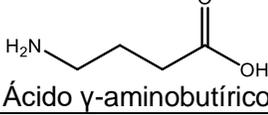
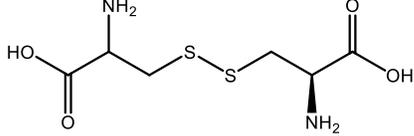
Aminoácidos		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Fresco Congelación Temp. Amb.	 <p style="text-align: center;">Alanina</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 <p style="text-align: center;">Arginina</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 <p style="text-align: center;">Ácido aspártico</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 <p style="text-align: center;">Ácido glutámico</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 <p style="text-align: center;">Cisteína</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 <p style="text-align: center;">Glicina</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 <p style="text-align: center;">Prolina</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)

[continuación]

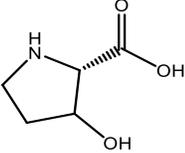
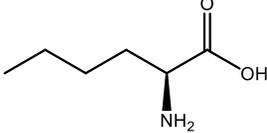
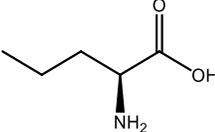
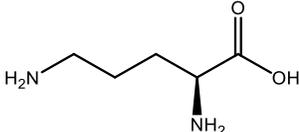
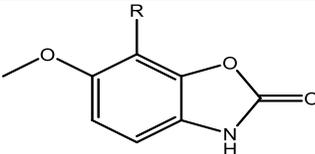
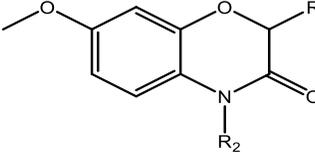
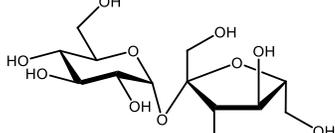
Tratamiento	Aminoácidos Metabolito	Referencia
Fresco Congelación Temp. Amb	 Serina	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O Soxhlet		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Fresco Congelación Temp. Amb	 Tirosina	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O Soxhlet		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 Histidina	(Martínez-Flores et al., 2008)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb	 Fenilalanina	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 Isoleucina	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O Soxhlet		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 Leucina	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O Soxhlet		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Fresco Congelación Temp. Amb.	 Lisina	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O Soxhlet		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
		(Valverde & Paredes-López, 1993)

[continuación]

Aminoácidos

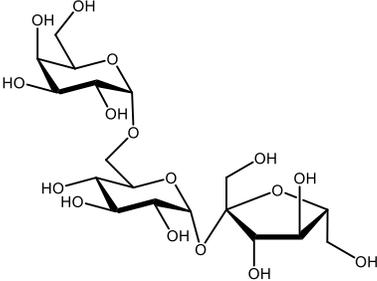
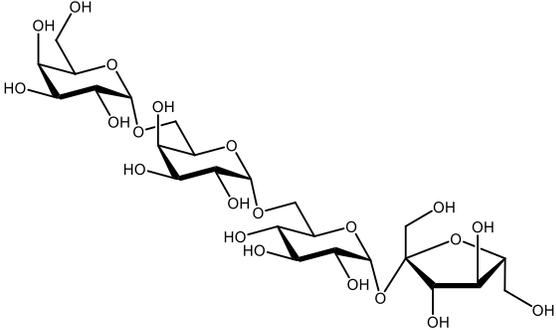
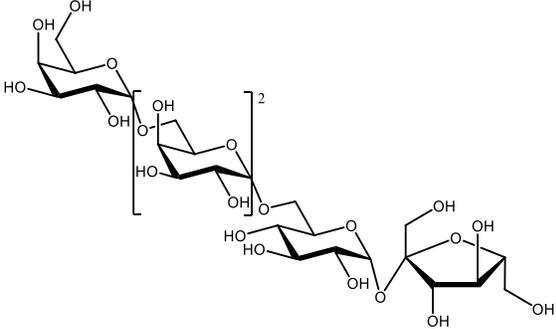
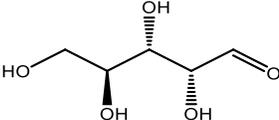
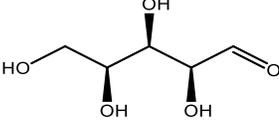
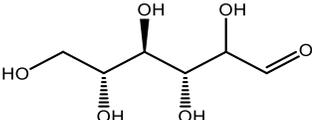
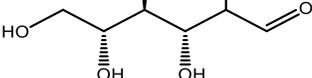
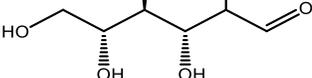
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Fresco Congelación Temp. Amb	 <p data-bbox="597 426 716 453">Metionina</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb	 <p data-bbox="602 657 708 684">Treonina</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		(Valverde & Paredes-López, 1993)
Fresco Congelación Temp. Amb	 <p data-bbox="597 951 716 978">Triptófano</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Fresco Congelación Temp. Amb	 <p data-bbox="618 1176 691 1203">Valina</p>	(Martínez-Flores et al., 2008)
Congelado Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Soxhlet		Valverde & Paredes-López, 1993)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O	 <p data-bbox="553 1392 764 1419">Ácido tricolómico</p>	(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O	 <p data-bbox="521 1524 789 1551">Ácido γ-aminobutírico</p>	(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O	 <p data-bbox="610 1696 699 1724">Cistina</p>	(Lizárraga-Guerra & López, 1996)

[continuación]

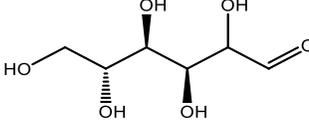
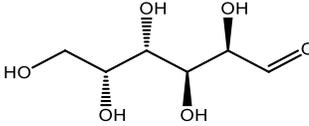
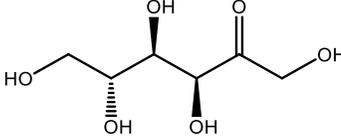
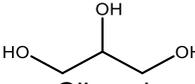
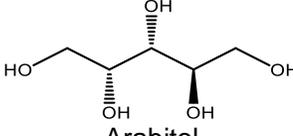
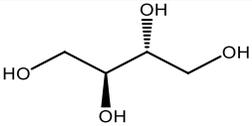
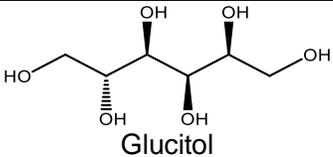
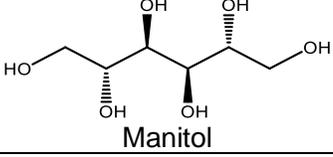
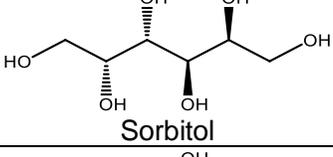
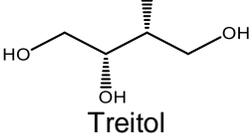
Aminoácidos		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Soxhlet	 Hidroxiprolina	(Valverde & Paredes-López, 1993)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O	 Norleucina	(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O	 Norvalina	(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Liofilizado Extracción MeOH-CF-H ₂ O	 Ornitina	(Lizárraga-Guerra & López, 1996)
Benzoxazoles		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Fermentado	 <p>R = H 6-metoxi-2-benzoxazolinona R = OCH₃ 7,6-dimetoxi-2-benzoxazolinona</p>	(Wu et al., 2023)
Benzoxazinas		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Fermentado	 <p>DIMBOA R₁= OH R₂=OH DIMBOA-Glc R₁= OGlc R₂=OH HMBOA R₁= OH R₂=H HMBOA-Glc R₁= OGlc R₂=H HDMBOA-Glc R₁= OGlc R₂=OCH₃</p>	(Wu et al., 2023)
Carbohidratos		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto EtOH	 Sacarosa	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto MeOH		(Valdez-Morales et al., 2010)

[continuación]

Carbohidratos

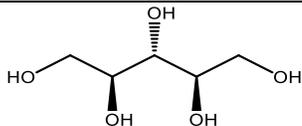
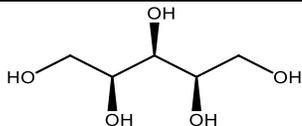
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto EtOH	 <p>Rafinosa</p>	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto EtOH	 <p>Estaquiosa</p>	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto EtOH	 <p>Verbascosa</p>	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto MeOH	 <p>Arabinosa</p>	(Valdez-Morales et al., 2010)
Liofilizado Extracto MeOH	 <p>Xilosa</p>	(Valdez-Morales et al., 2010)
Liofilizado Extracto EtOH	 <p>Glucosa</p>	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto MeOH	 <p>Glucosa</p>	(Valdez-Morales et al., 2010)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 <p>Glucosa</p>	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)

[continuación]

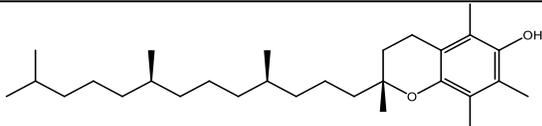
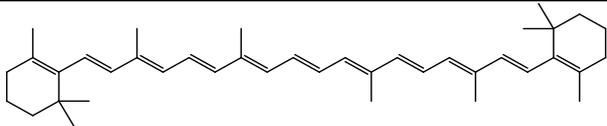
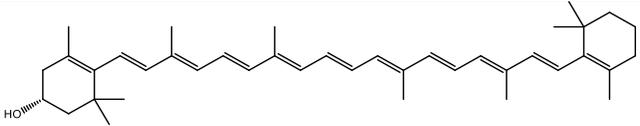
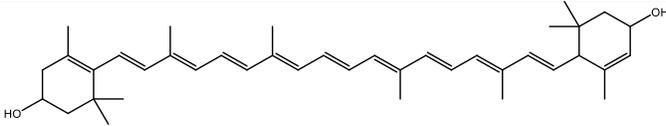
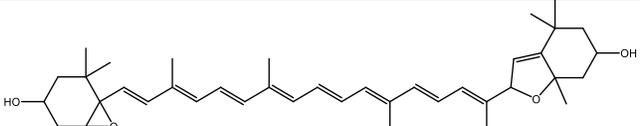
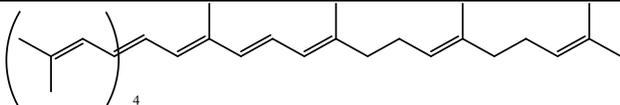
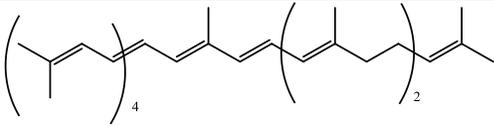
Carbohidratos		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto MeOH	 Manosa	(Valdez-Morales et al., 2010)
Liofilizado Extracto MeOH	 Galactosa	(Valdez-Morales et al., 2010)
Liofilizado Extracto EtOH	 Fructosa	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto MeOH		(Valdez-Morales et al., 2010)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O		(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Glicerol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Arabitol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Eritritol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Glucitol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Manitol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Sorbitol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Treitol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)

[continuación]

Carbohidratos

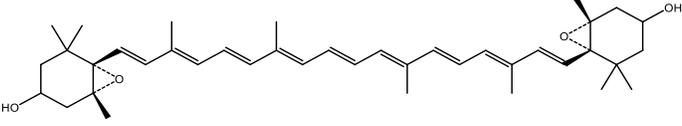
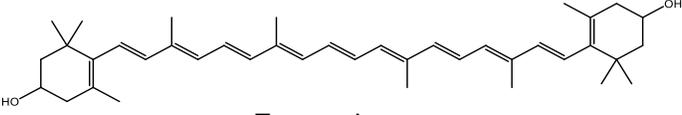
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Ribitol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Xilitol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)

Carotenos

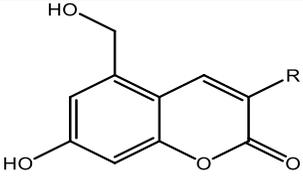
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Extracto EtOH Cocido y fresco	 α -tocoferol	(S. López et al., 2017)
<i>U. maydis</i> FB1 y FB2	 β -caroteno	(Estrada et al., 2009)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 β -criptoxantina	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Luteína	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Luteoxantina	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Fitoflueno	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Fitoeno	(S. López et al., 2017)

[continuación]

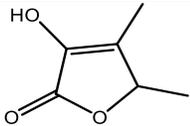
Carotenos

Tratamiento	Metabolito	Referencia
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Violaxantina	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Zeaxantina	(S. López et al., 2017)

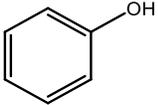
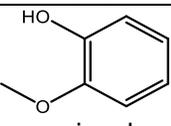
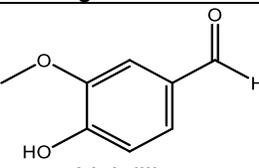
Cumarinas

Tratamiento	Metabolito	Referencia
Fermentado	 Ustilago F Ustilago G R ₁ = Ácido carboxílico R ₁ = (R)-3-hydroxybutanal	(Wu et al., 2023)

Dihidrofuranos

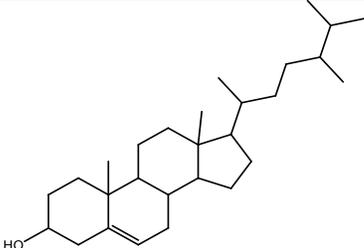
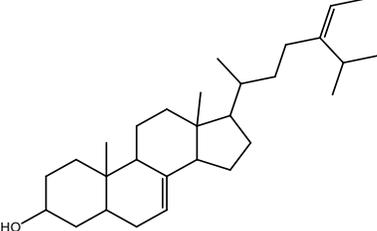
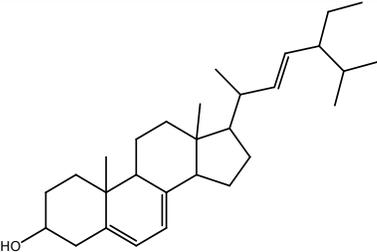
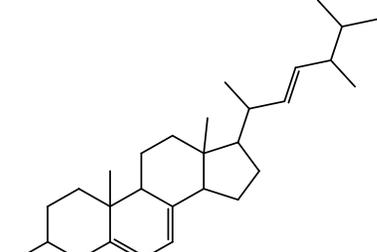
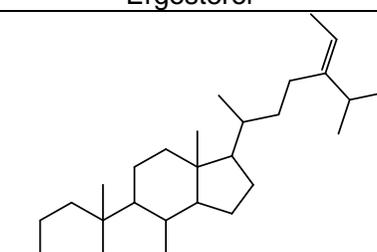
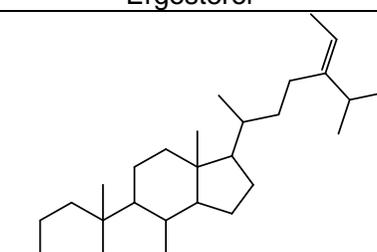
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Sotolon	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)

Fenoles

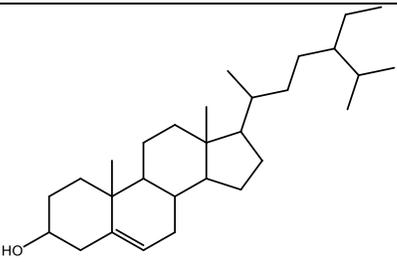
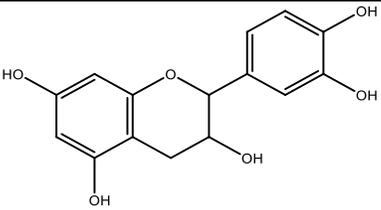
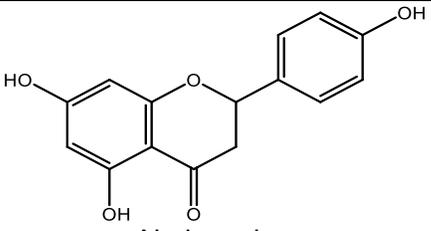
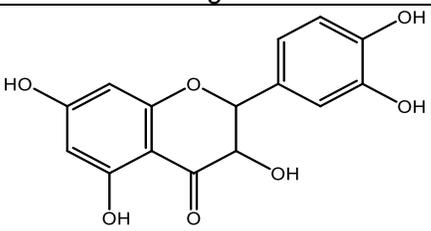
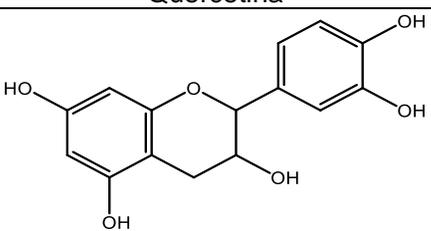
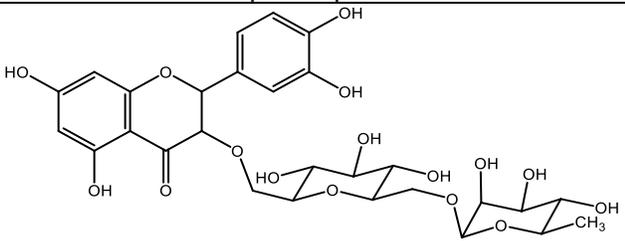
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O+	 Fenol	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 guaiacol	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)
Liofilizado Cocido Extracción Et ₂ O	 Vainillina	(Lizárraga-Guerra et al., 1997)

[continuación]

Fitoesteroles

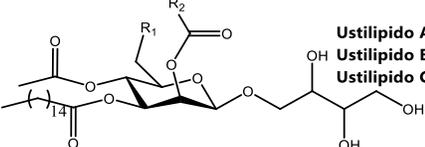
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Campesterol-3-β-glucopiranosido	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Δ7-avenastero	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Δ7-stigmasterol	(S. López et al., 2017)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Ergosterol	(S. López et al., 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Fucosterol	(Valdez-Morales et al., 2016)
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Fucosterol	(S. López et al., 2017)

[continuación]

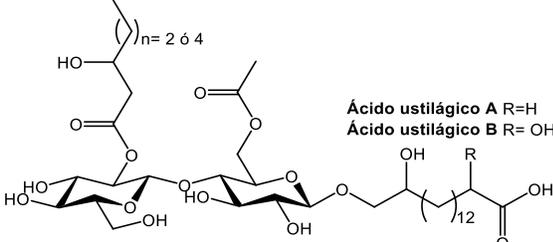
Fitoesteroles		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Sitosterol	(S. López et al., 2017)
Flavonoides		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Extracto EtOH Cocido y fresco	 Catequina	(S. López et al., 2017)
Liofilizado Extracto MeOH		(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado Extracto MeOH	 Naringenina	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado Extracto MeOH	 Quercetina	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado Extracto MeOH	 Epicatequina	(S. López et al., 2017)
Liofilizado Extracto MeOH	 Rutina	(Valdez-Morales et al., 2016)

[continuación]

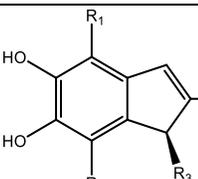
Glucolípidos

Tratamiento	Metabolito	Referencia
	 <p> Ustilipido A R₁= -COO R₂= -(CH₂)₃-CH₃ Ustilipido B R₁= -COO R₂= -(CH₂)-CH₃ Ustilipido C R₁= -COO R₂= -Isopropil </p>	(Kurz et al., 2003)

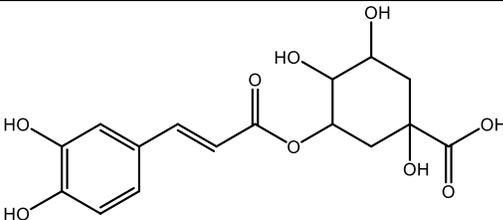
Ustilipidos

Cultivo Ustilago maydis PRL-627	 <p> Ácido ustilágico A R=H Ácido ustilágico B R=OH </p>	(Haskins & Thorn, 1951)
---------------------------------------	--	-------------------------

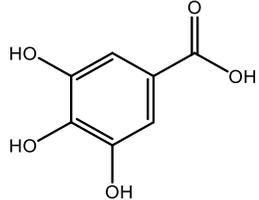
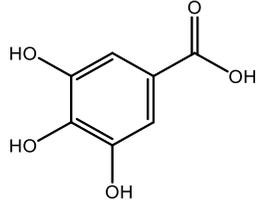
Indenos

Tratamiento	Metabolito	Referencia
Fermentado	 <p> Ustilagol B R₁= H R₂=OMe R₃= OH Ustilagol C R₁= H R₂=OMe R₃=OMe Ustilagol D R₁= OMe R₂= H R₃= OH Ustilagol E R₁= OMe R₂=H R₃= OMe </p>	(Wu et al., 2023)

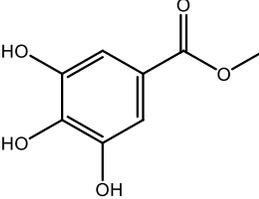
Ácidos benzoicos y cinámicos

Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto MeOH		(S. López et al., 2017)

Ácido clorogénico

Liofilizado Extracto MeOH		(S. López et al., 2017)
Liofilizado Extracto EtOH		(Rosalba Beas et al., 2011)

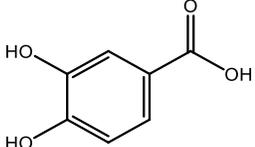
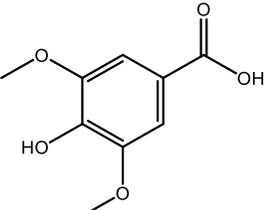
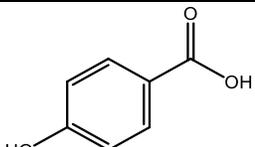
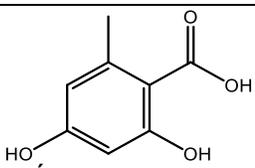
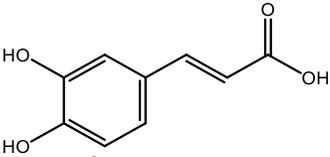
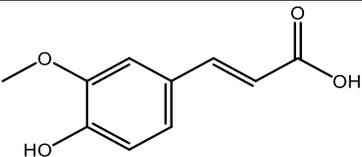
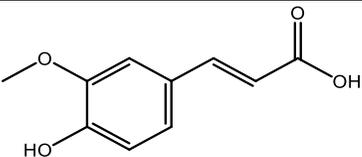
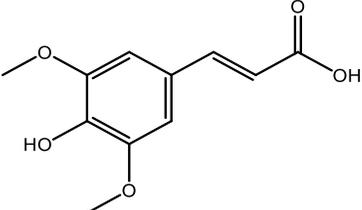
Ácido gálico

Liofilizado Extracto MeOH		(S. López et al., 2017)
------------------------------	---	-------------------------

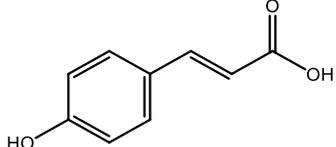
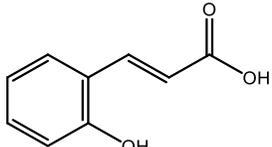
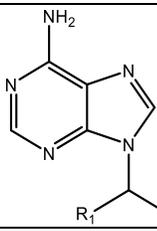
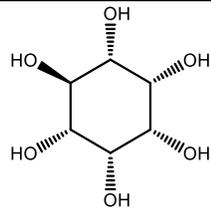
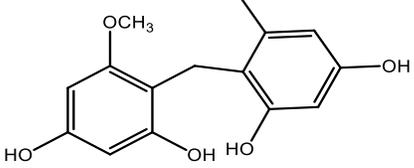
Metil galato

[continuación]

Ácidos benzoicos y cinámicos

Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto EtOH	 Ácido protocatecúico	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto EtOH	 Ácido siríngico	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto EtOH	 Ácido 4-hidroxibenzoico	(Rosalba Beas et al., 2011)
Fermentado	 Ácido orselínico	(Wu et al., 2023)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido cafeico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido ferúlico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado Extracto EtOH	 Ácido ferúlico	(Rosalba Beas et al., 2011)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido sinápico	(Valdez-Morales et al., 2016)

[continuación]

Ácidos benzoicos y cinámicos		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido <i>p</i> -cumárico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Liofilizado Extracto MeOH	 Ácido <i>o</i> -cumárico	(Valdez-Morales et al., 2016)
Purinas		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
-	 <p> Ustilagomaydisina A $R_1 = -(CH_2)_7-CH_3$ $R_2 = -(CH_2)_6-COOH$ Ustilagomaydisina B $R_1 = -(CH_2)_3-CH_3$ $R_2 = -CH_3$ Ustilagomaydisina C $R_1 = -(CH_2)_4-CH_3$ $R_2 = -CH_3$ </p>	(S. Q. Wang et al., 2014)
Otros		
Tratamiento	Metabolito	Referencia
Liofilizado Extracto MeOH: CHCl ₃ :H ₂ O	 Inositol	(Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998)
Fermentado	 Ustilagol F	(Wu et al., 2023)

Acorde a la tabla previa, apreciamos que este hongo posee una variedad de metabolitos de tipo polifenólico, lo que ha llevado a su cuantificación mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu en muestras de México y Turquía, realizado por diferentes grupos de investigación, (Tabla 4).

Tabla 4. Contenido de polifenoles totales reportado para huitlacoche en la literatura

Origen	Tratamiento	Extracto	Concentración	Referencia
			$3.11 \pm 0.07 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$4.21 \pm 0.09 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$2.49 \pm 0.03 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$13.94 \pm 0.04 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$7.63 \pm 0.02 \frac{mgEAG}{mg}$	
^a Edo. de México	Seco	Hidroetanólico	$4.9 \pm 0.03 \frac{mgEAG}{mg}$	(López-Martínez et al., 2022)
			$9.21 \pm 0.08 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$7.08 \pm 0.03 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$6.95 \pm 0.02 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$7.52 \pm 0.03 \frac{mgEAG}{mg}$	
			$7.63 \pm 0.04 \frac{mgEAG}{mg}$	
^a Sonora	Liofilizado	Acuoso	$222.19 \pm 12.3 \frac{mgEAG}{100g}$	(M. L. López & Baeza, 2018)
		Metanólico	$661.45 \pm 20.56 \frac{mgEAG}{100g}$	
^a Guanajuato	Fresco	Etanólico	$49.6 \pm 0.02 \frac{\mu gEAG}{mL}$	(S. López et al., 2017)
	Cocido		$70.9 \pm 0.1 \frac{\mu gEAG}{mL}$	
	Fresco		$182.7 \pm 0.2 \frac{\mu gEAG}{mL}$	
	Cocido		$161.7 \pm 0.1 \frac{\mu gEAG}{mL}$	
^a Turquía	Seco	Hidroalcohólico	$113.11 \pm 0.2 \frac{mgEAG}{kg}$	(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
^b Guanajuato	Crudo	Metanólico	$602.3 \frac{mgEAG}{100g}$	(Valdez-Morales et al., 2016)
	Cocido		$700.0 \frac{mgEAG}{100g}$	
^a Aguascalientes			$630 \pm 0.02 \frac{mgEAG}{100g}$	
^a Jalisco			$450 \pm 0.02 \frac{mgEAG}{100g}$	
^a Guanajuato			$450 \pm 0.03 \frac{mgEAG}{100g}$	
^a Guanajuato	Liofilizado	Metanólico	$640 \pm 0.03 \frac{mgEAG}{100g}$	(Rosalba Beas et al., 2011)
^a Puebla			$480 \pm 0.02 \frac{mgEAG}{100g}$	
^b Amarillo			$500 \pm 0.00 \frac{mgEAG}{100g}$	
^b Negro			$460 \pm 0.01 \frac{mgEAG}{100g}$	
^b Pipitillo			$540 \pm 0.02 \frac{mgEAG}{100g}$	

^aColectado; ^bInoculado

2.5 Encapsulación

Es una tecnología que permite encapsular sustancias sólidas, líquidas o gaseosas en matrices, las cuales pueden ser liberadas bajo ciertas condiciones controladas, (Jafari, 2017). El objetivo primordial es proteger el compuesto activo encapsulado (material central) contra entornos desfavorables o adversos (como la luz, la humedad, la temperatura y el oxígeno)

Dependiendo del tamaño de la partícula encapsulada resultante obtenida, el proceso de encapsulación puede denominarse macro, micro y nanoencapsulación. En general, las propiedades de los materiales encapsulados mejoran con el aumento de la relación superficie-volumen y, por lo tanto, se prefieren la micro y nanoencapsulación a la macroencapsulación (Vimala Bharathi et al., 2018).

2.5.1 Microencapsulación

La microencapsulación involucra un proceso de encapsulamiento donde la cubierta suele ser insoluble y no reactiva con el núcleo; y dependiendo de sus aplicaciones, puede estar hecho de gomas, proteínas, lípidos y polímeros sintéticos (Desai & Jin Park, 2005); como resultado se obtienen microcápsulas de diferentes tamaños que se encuentran dentro del rango de 100 nm a 1000 nm, (Gaonkar et al., 2014), dependiendo de la técnica de microencapsulación utilizada, (Tabla 5).

Tabla 5. *Métodos de microencapsulación de alimentos, modificado de (Jafari, 2017)*

Tecnología	Tamaño [μm]
Secado por aspersión	10–400
Recubrimiento de lecho fluido	20–200
Secado por congelación o al vacío	20–5000
Enfriamiento/refrigeración por aspersión	20–200
Inyección de fusión	200–2000
Extrusión por fusión	300–5000
Emulsificación	0.2–5000
Coacervación	10–800
Encapsulación por expansión rápida de fluido supercrítico	10–400
Atrapamiento de liposomas	10–1000
Complejización de inclusión	0,001–0,01
Preparación de microesferas vía emulsificación	10–1000

En cuanto a la morfología de los microencapsulados se encuentran dos tipos, una de ellas son las microcápsulas caracterizadas por poseer un núcleo interior y una cubierta exterior definidos; en su contraparte, en el caso de las microesferas, el ingrediente activo está disperso dentro de la matriz generando una exposición del encapsulado al situarse cerca o en la superficie de la microesfera, (Arenas-Jal et al., 2020; Gaonkar et al., 2014), ver Figura 4.

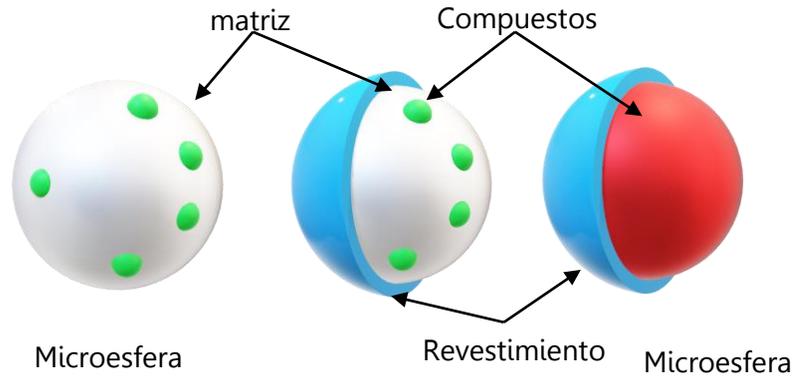


Figura 4. Morfologías de los microencapsulados, tomado y modificado de (Agnihotri et al., 2012)

2.5.1.1 Alginato.

El alginato (ALG) es un polisacárido que consiste en unidades de ácido *D*-manurónico con enlaces β -(1-4) y unidades de ácido *L*-gulurónico con enlaces β -(1-4), Figura 5.

Principalmente este compuesto se encuentra en algas marinas pardas como especies de *ascophyllum*, *durvillaea*, *ecklonia*, *laminaria*, *lessonia*, *macrocystis*, *sargazo* y *turbinaria*, (Alihosseini, 2016), sin embargo, también es producido por dos géneros de bacterias como son *Pseudomonas* y *Azotobacter vinelandii*, (Abdul Khalil, 2020; Martau et al., 2019).

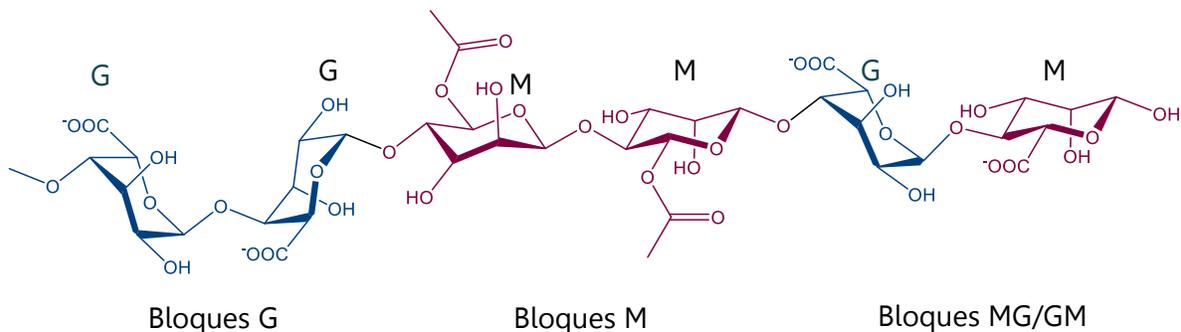


Figura 5. Estructura de cadena de alginato, tomado y modificado de (Martau et al., 2019)

El ALG es un polímero aniónico que en presencia de cationes divalentes (Ca^{2+}) se generan interacciones entre Ca^{2+} y los grupos carboxilo (COO^-) de los bloques de ácido gulurónico, favoreciendo la formación de geles situación contraria que en aquellos ricos en bloques de manuronato, (Łętocha et al., 2022; Wilkerson, 2022)

Este apresamiento del ion Ca^{2+} por los bloques G crean regiones que forman una estructura denominada caja de huevo como se muestra en la Figura 6, (Hasnain et al., 2020; Wilkerson, 2022).

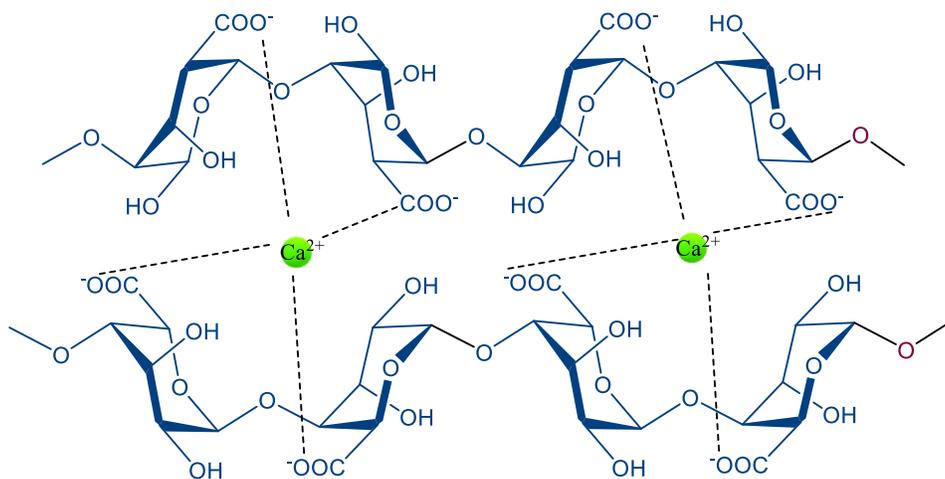


Figura 6. Estructura de caja de huevo producida por alginato

2.5.1.2 Quitosano.

El quitosano (QTS) es un polisacárido constituido por unidades de *D*-glucosamina y *N*-acetil-*D*-glucosamina y el número de estos depende del grado de la *N*-desacetilación de la quitina, Figura 7.

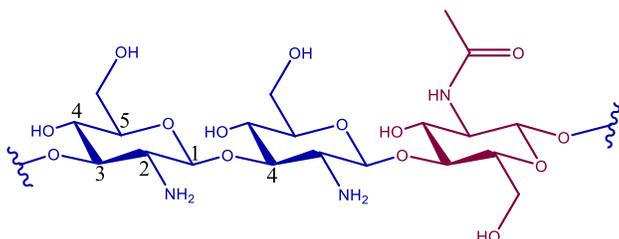


Figura 7. Estructura del quitosano

Este polisacárido deriva de la quitina, la cual está presente en diversas fuentes naturales como es en el exoesqueleto de crustáceos, (Aranaz et al., 2021) insectos, algas y en la pared celular de hongos. El quitosano es menos frecuente en la naturaleza y se encuentra en algunos hongos (Mucoraceae).

Además, debido a los múltiples grupos funcionales (grupos hidroxilo, amino y carboxilo) que posee el QTS, estos pueden ser modificados químicamente lo que da pie a la variabilidad de sus propiedades físico-químicas mejorando así aspectos de solubilidad y mejorar la estabilidad, (Li et al., 2020)

Además, la naturaleza catiónica del QTS puede ser útil para mejorar su estabilidad al combinarlo con otros polímeros aniónicos como el alginato, poli (L-lisina), poli(ácido γ -glutámico) (Niculescu & Grumezescu, 2022).

2.5.1.2 Quitosano-Alginato.

El empleo de más de un polímero como matriz encapsulante es un recurso que permite mejorar las características de liberación del compuesto de interés, es por ello, que una de las mezclas que se emplea es el alginato de sodio y el quitosano.

Sabemos que el ALG es un polímero aniónico, permitiendo así una interacción electrostática con polímeros catiónicos como es el caso del quitosano, por consiguiente, da origen a complejos polielectrolitos. Dicha interacción iónica, genera enlaces intramoleculares entre los grupos de ácido carboxílico (COO^-) del ALG y los grupos amina protonados (NH_3^+) del QTS. Permitiendo así la obstrucción de los poros en las cápsulas de ALG por el QTS. (Lim et al., 2015)

Dicho polielectrolito ALG-QTS, (Figura 8), se caracteriza por una estabilidad térmica, química y mecánica mejorada de los polímeros constituyentes. Además, las formas de dosificación de fármacos basadas en los complejos ALG-QTS se caracterizan por un mayor grado de hinchamiento, fuerza mucoadhesiva y liberación prolongada del compuesto activo, (Szekalska et al., 2017).

Ambos polisacáridos son sensibles al pH, lo que puede ser útil para controlar la liberación del fármaco a niveles de pH específicos ajustando la proporción de ALG-QTS utilizada, (Wathoni et al., 2024)

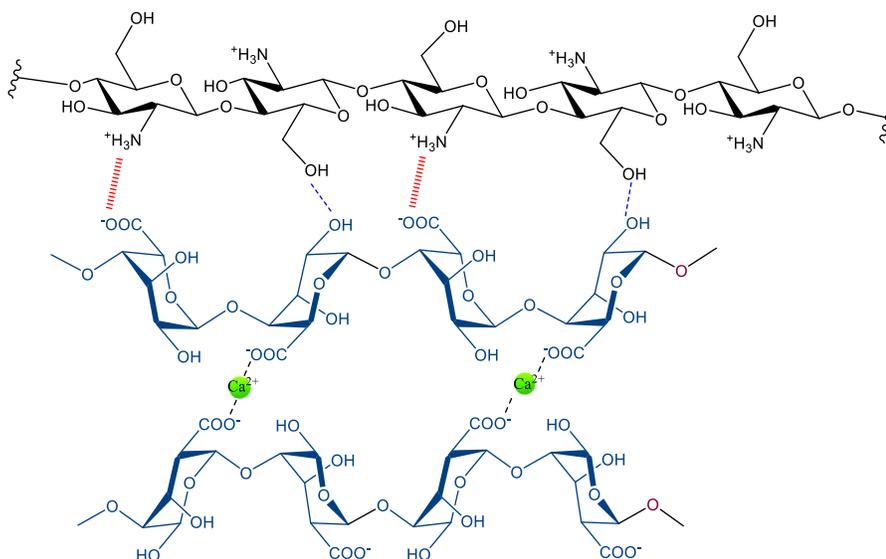


Figura 8. Interacción entrecruzamiento de quitosano-alginato, tomado y modificado de (Feyissa et al., 2023)

3. Justificación

Los hongos se han convertido en objeto de gran interés en el sector alimentario gracias a sus propiedades nutricionales únicas y su sostenibilidad ambiental, por lo que su investigación, producción y promoción de este recurso, es vital para convertirlo en un componente esencial de nuestra dieta diaria.

Bajo este contexto, la comunidad científica y la industria alimentaria están en una permanente búsqueda de formas de mejorar la calidad de los alimentos, dirigiendo la investigación en técnicas de encapsulación basado en sistemas de administración con biopolímeros; abriendo así el camino hacia productos alimenticios más saludables, sin comprometer sus propiedades, como componentes bioactivos o funcionales.

Por lo que México se encuentra en un panorama favorable al ser un país megadiverso lo que confiere un plétórico de bondades por su riqueza biocultural, existiendo 400 especies de hongos que en los grupos étnicos tienen un uso como alimento y medicina tradicional. Así mismo, México tuvo una producción de 8 142 toneladas acorde al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en el 2023.

Dentro de los hongos consumidos tradicionalmente, están las patitas de pájaro (*Ramaria botrytis*), yemas (*Amanita caesarea*), xolete rosa (*Entoloma clypeatum*), huitlacoche (*Ustilago maydis*); este último, acorde a su investigación nutrimental, aporta macronutrientes (hidratos de carbono, lípidos, proteínas) y micronutrientes (fibra, minerales, vitaminas).

Sin embargo, también encontramos micronutrientes como ácidos grasos esenciales (ácido oleico y ácido linoleico) que son fuentes de ω -3 y ω -6, carotenos (α -tocoferol), esteroides, (ergosterol), polifenoles (catequina, ácido ferúlico) que han manifestado actividades antioxidantes y anticancerígenas; destacando la abundancia de aminoácidos esenciales.

Por lo que el presente proyecto, está dirigido con el enfoque de una investigación del perfil micoquímico de los extractos etanólicos de este hongo tradicional mexicano, así como en la obtención y análisis de sus compuestos bioactivos de naturaleza fenólica.

De igual forma, se busca un material adecuado para la microencapsulación de los extractos etanólicos, y así en un futuro continuar con su aplicación como nutraceutico con propiedades farmacológicas. Además, con el fin de promover el consumo de un alimento autóctono bajo la alternativa de la microencapsulación debido a que nos brinda beneficios a la salud.

4. Hipótesis

Los extractos etanólicos del huitlacoche podrán incorporarse a un sistema de microencapsulación y contendrán micoquímicos bioactivos que sustentarán la propuesta de su posible uso nutracéutico.

5. Objetivo General

Analizar el contenido micoquímico en extractos etanólicos del hongo huitlacoche (*Ustilago maydis*) y llevar a cabo su encapsulación.

5.1 Objetivos Particulares

1. Cuantificar y comparar el contenido de polifenoles totales de los extractos etanólicos de huitlacoche fresco y cocido.
2. Aislar y caracterizar los micoquímicos presentes en ambos extractos.
3. Encapsular los extractos de huitlacoche a base de alginato de sodio y quitosano, y analizar su tamaño y morfología.
4. Contribuir a la información del contenido micoquímico del *U. maydis* (Huitlacoche).

6. Materiales y Métodos

En el siguiente diagrama 1, se representa el esquema general de la metodología empleada en este proyecto, que consta de extracción, purificación y caracterización, así como microencapsulación de los extractos etanólicos de huitlacoche.

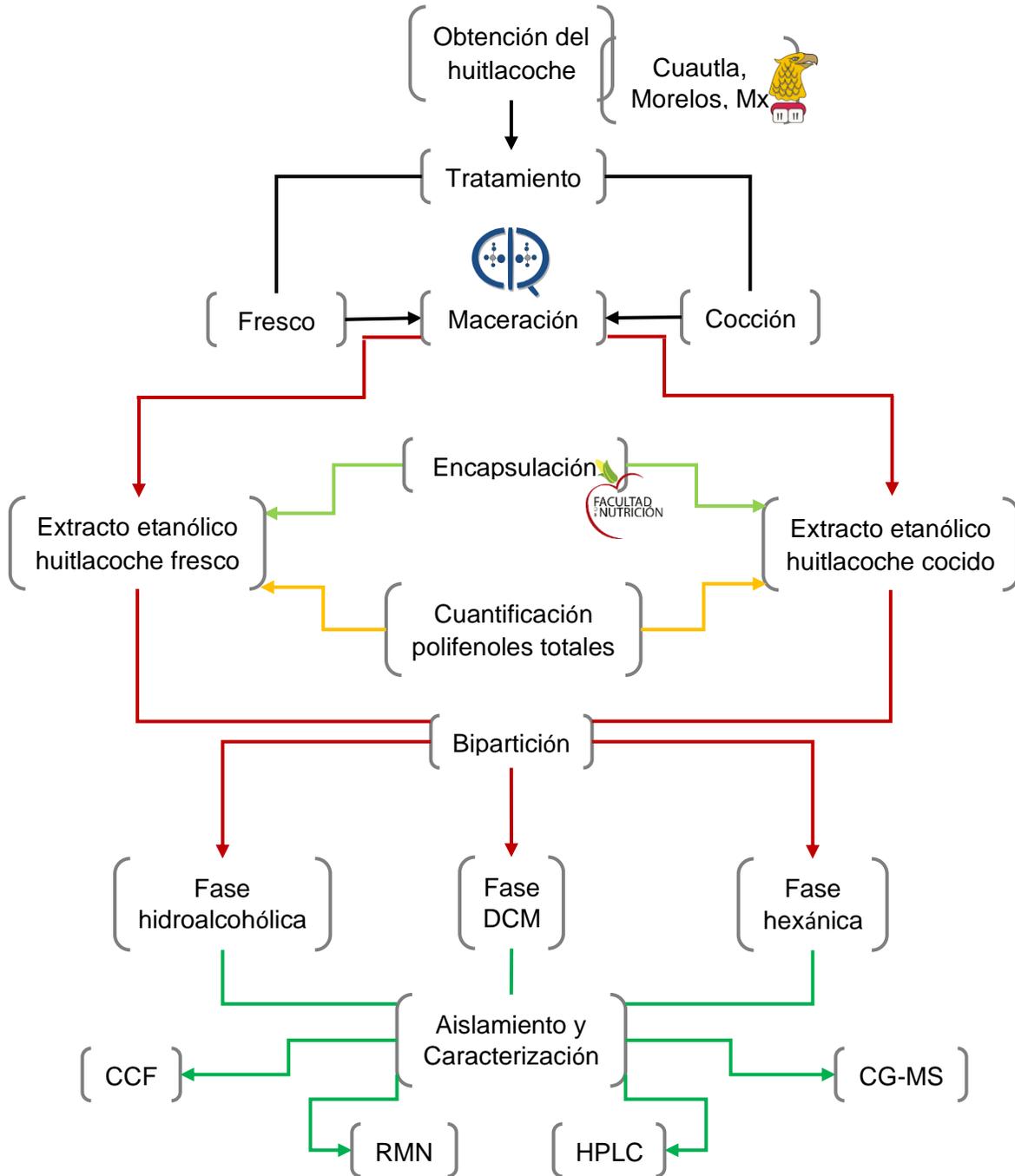


Diagrama 1. Metodología general del proyecto.

6.1 Obtención del Material Fúngico

El hongo huitlacoche fue adquirido en la central de abastos en Cuautla, Morelos, México; en el mes de Agosto de 2022. En su conjunto se emplearon 17 kg, de los cuales 8 kg fueron utilizados para la maceración de huitlacoche fresco y 9 kg para su tratamiento en cocción y posterior maceración de ambos, (Figura 9).



Figura 9. *Materia prima de huitlacoche*

6.2 Obtención del Extracto

6.2.1 Huitlacoche Fresco (HF)

La materia orgánica (huitlacoche) (8 kg) en fresco se cortó en trozos pequeños de alrededor de 1-2 cm, posteriormente se extrajo mediante maceración con etanol cada 72 horas por triplicado. Finalmente se eliminó el disolvente con el uso de un evaporador rotatorio (Buchi RII) para obtener el extracto etanólico del huitlacoche en fresco.

6.2.2 Huitlacoche Cocido (HC)

Se utilizaron 9 kg de huitlacoche, se cortó en trozos pequeños de alrededor de 1-2 cm, y se llevó bajo las condiciones de cocción en una olla peltre llevada a calentamiento a 130 °C por 20 minutos. Se extrajo mediante maceración con etanol cada 72 horas por triplicado. Finalmente se eliminó el disolvente con el uso de un evaporador rotatorio (Buchi RII) para obtener el extracto etanólico del huitlacoche cocido.

6.3 Bipartición de los Extractos

Una vez obtenidos los extractos, se realizó una extracción líquido-líquido empleando disolventes de distinta polaridad (hexano, diclorometano (DCM) y agua:etanol), ver diagrama 2.

En primera instancia, se pesó 20 g del extracto etanólico de huitlacoche fresco (E.E.H.F.) para disolverlo en 400 mL de etanol:agua (7:3) dicha solución se colocó en un embudo de separación de 1000 mL (Pyrex®), posteriormente, se adicionó 400 mL de hexano y se agitó vigorosamente el embudo, liberando presión en intervalos. La extracción con este disolvente se hizo por triplicado, apartando la fase hexánica del sistema para concentrarlo mediante el uso de un rotaevaporador y colocarlo en un vial para su almacenamiento.

Posteriormente, la solución de etanol:agua (7:3) pasó a una proporción 5:5 previo a la colocación de 400 mL de diclorometano en el embudo, se repitió el mismo procedimiento previo para separar, concentrar mediante un evaporador rotatorio la fase de DCM y la fase hidroalcohólica, se colocaron en un vial para su correcto etiquetado y almacenamiento.

Esto procedimiento se sigue para para el extracto etanólico de huitlacoche cocido (E.E.H.C.) y del E.E.H.F. hasta emplear 180 g de extractos.

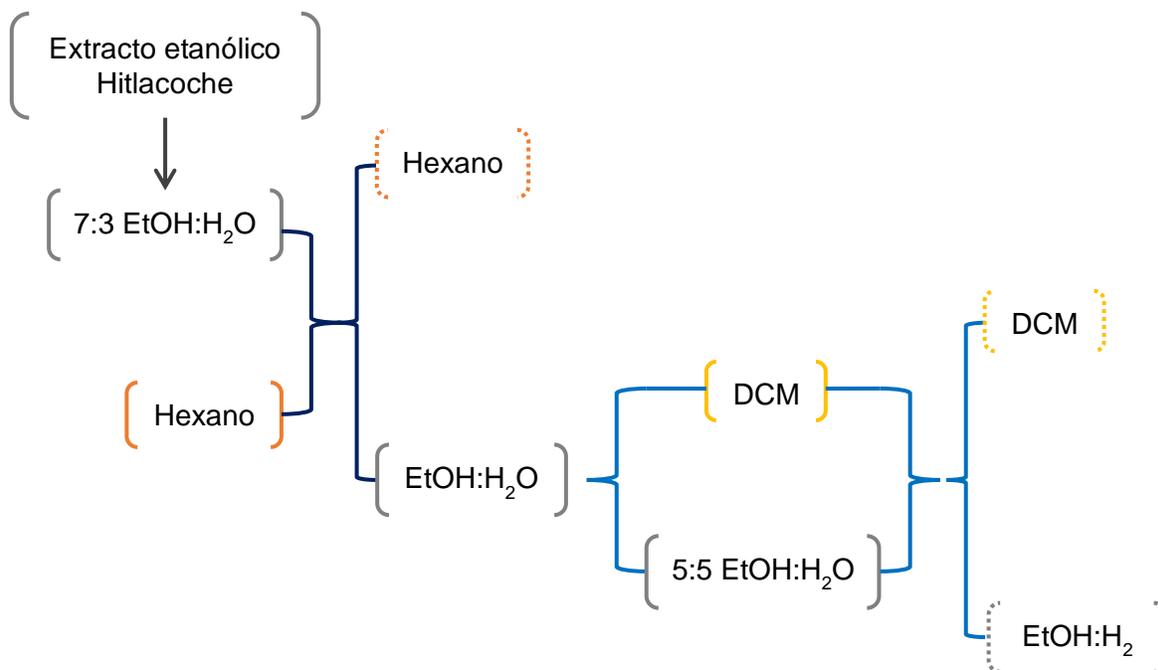


Diagrama 2. Condiciones de bipartición para los extractos etanólicos de huitlacoche.

6.4 Cuantificación de Polifenoles Totales

6.4.1 Preparación de las Soluciones

El reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N (CAS 10377-48-7, Sigma- Aldrich) se preparó diluyendo en una relación 1:2 con agua destilada. Se preparó con 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu con 5 mL de agua destilada, se almacenó en un frasco ámbar y en un ambiente libre de luz. Posterior se preparó una solución de bicarbonato de sodio al 7.5% a partir de 1.5 g de NaHCO_3 y se adicionó 20 mL de agua destilada.

Por otro lado, se utilizó como control al ácido gálico (CAS 149-91-7, Sigma-Aldrich), a partir de una solución stock de $1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, se hicieron seis diluciones seriadas de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 $\mu\text{g/mL}$.

6.4.2 Desarrollo del Método de Folin-Ciocalteu

La metodología que se siguió fue con base a lo descrito por (Jurado et al., 2016), y se modificó para llevar a cabo la reacción directamente en placas de 96 pozos (Costar®). Los extractos etanólicos de huitlacoche fresco y cocido se prepararon a una concentración de 10 mg/mL

Posteriormente se colocaron 28 μL de cada extracto en cada pozo de la placa, a continuación, se adicionó 42 μL de la solución Folin-Ciocalteu (diluida previamente 1:2 con agua), posterior a esto, se dejó reposar durante 5 minutos. Transcurrido lo anterior se vertieron 42 μL de NaHCO_3 7.5 % y adicionalmente se colocaron 168 μL de agua destilada, por último, se agitaron las soluciones de las fracciones para almacenarlas en un ambiente sin luz por 30 minutos. Las absorbancias se midieron a 760 nm en un fotómetro de microplacas Multiskan™ GO (Thermo Scientific™),

El análisis estadístico se hizo en Excel determinando la ecuación de la recta y por interpolación con los valores de las muestras problema. Los resultados de la cuantificación fueron expresados en mgEAG/g.

6.5 Técnicas Cromatográficas

La identificación de metabolitos presentes en los extractos etanólicos de HC y HF se llevó a cabo mediante técnicas de cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución y en columna fase normal y fase reversa, flash, así como cromatografía en capa fina

6.5.1 Cromatografía en Columna Abierta

La separación y purificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco se aislaron por cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria sílica (230-40 mesh ASTM, cas 7631-86-9, Merk) que se empacó en columnas de vidrio de diámetros y longitudes según la cantidad de muestra a purificar con base a lo publicado por (Taber, 1982), en cuanto a la fase móvil se usó un gradiente hexano-AcOEt.

6.5.2 Cromatografía en Capa Fina

Por otro lado, para el monitoreo de las fracciones se empleó cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60 F₂₅₄ (1.05554, Merck), posterior a su elución las placas se observaron bajo una lámpara de luz UV (CAMAG®) con un haz de luz en $\lambda=254$ nm y $\lambda=366$ nm, visualizando aquellos compuestos fluorescentes debido a sus grupos cromóforos (dobles enlaces conjugados). Para la visualización de las placas se utilizaron distintos reveladores como yodo y ácido sérico

6.5.3 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

Para conocer la composición química de los extractos etanólicos y sus respectivas fases de DCM e hidroalcohólico, se tomaron en cuenta los polifenoles reportados por (S. López et al., 2017; Rosalba Beas et al., 2011; Valdez-Morales et al., 2016) se seleccionaron 12 polifenoles (5 ácidos benzoicos, 4 ácidos cinámicos, 2 flavonoides, 1 flavonoide glucosilado) como estándares: ácido gálico (CAS 149-31-7, Sigma-Aldrich), ácido siríngico (S6881-10G, CAS 331-39-5, Sigma-Aldrich), ácido 4-hidroxibenzoico (CAS 99-96-7, Sigma-Aldrich), ácido vainílico (H36001, CAS 121-34-6, Sigma-Aldrich), ácido protocatecuico (CAS 99-50-3, Sigma-Aldrich); ácido cafeico (CAS 331-39-5, Sigma-Aldrich), ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico (C9008-25G, CAS 0198-4, Sigma-Aldrich), ácido cinámico; catequina (C1251, CAS 225937-10-0, Sigma-Aldrich), quercetina (Q0125-10G, CAS 117-39-5, Sigma-Aldrich), rutina (R-5143, CAS 207671-50-9, Sigma-Aldrich).

Los tiempos de retención y espectros de UV-Vis se pueden consultar en anexos 10.1 y 10.2. El equipo empleado fue un cromatógrafo de HPLC Agilent 6200 acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) bajo las condiciones adaptadas con base a lo descrito por (Pati et al., 2014), (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de operación de HPLC

Técnica	Cromatografía Fase Reversa
Columna	Chromolith® Performance RP-18 endcapped100-4.6 HPLC column
T columna (°C)	20 °C
Fase Móvil	A) Agua:Ác. Fórmico 0.2% B) ACN
Gradiente	I) 0 – 10 min 98% A – 2 % B II) 10 – 25 min 87% A – 13 % B III) 25- 65 min 85% A-15% B
Vol. De inyección	2 µL y 3 µL
Flujo	0.2 mL/min
Detector	Detector de Arreglo de Diodos (DAD)
Longitud de Onda	210 nm, 280 nm, 300 nm, 370 nm
Tiempo	65 min

6.5.4 Cromatografía de Gases

El análisis de la composición química de las fases hexánicas de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco se realizó mediante un cromatógrafo de gases Agilent Technology 6890 acoplado a un detector de masas 5973N con las condiciones descritas en la Tabla 7. Los espectros de masas se compararon con la Biblioteca NIST versión 14

Tabla 7. Condiciones de operación para cromatografía de gases

Técnica de Ionización	Impacto electrónico
Columna	HP-5ms 30m x 0.250mm x 0.25 µm
Gas acarreador	Helio 1 mL/min, flujo constante 40°C durante 1 min
Horno	10 °C/min hasta 250 °C durante 5 min 10 °C/min hasta 285 °C durante 10 min
Inyector	250 °C, splitless
Detector	MSD
Fuente iónica	250 °C
Biblioteca	NIST14

6.6 Técnicas de Elucidación

6.6.1 Resonancia Magnética Nuclear

La caracterización de los compuestos puros aislados y de las fases de DCM de los extractos etanólicos del huitlacoche cocido y fresco se llevó a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^1H y ^{13}C y 2D, en equipos, 80 MHz, 500 MHz (Bruker AVANCE III HD), 600 MHz (Jeol ECZ).

6.6.2 Espectrometría de Masas de Alta Resolución

Como parte de la caracterización de los compuestos aislados de los extractos etanólicos se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución (JEOL MS-700) con la técnica de ionización de FAB⁺.

6.7 Micoquímica

6.7.1 Fraccionamiento Primario Fases de DCM

La fase de diclorometano del extracto de huitlacoche cocido y del extracto de huitlacoche fresco se fraccionaron a través de cromatografía en columna abierta.

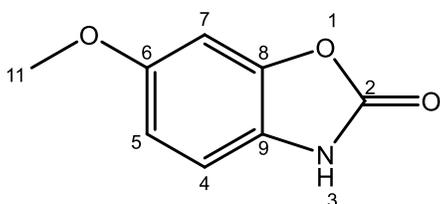
6.7.1.1 Huitlacoche Cocido.

La fase de diclorometano (DCM) del huitlacoche cocido (500 mg) se sometió a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna, empleando 50 g de sílica , (230-40 mesh ASTM, cas 7631-86-9, Merk), en una columna de 45.3 cm con un gradiente de n-hexano: AcOEt (90:10 → 00:100) y una lavado de metanol. Recolectando fracciones de 15 mL cada uno, las cuales se concentraron con ayuda de un rotaevaporador y se agruparon en 06 reuniones acorde a su homogeneidad según lo visto por cromatografía en capa fina (CCF), ver Tabla 8.

Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de la fase de DCM del extracto de huitlacoche cocido.

Fracciones	Sistema Hex:AcOEt	Reunión	Peso
01-16	90:10 → 85:15	Λ01	1.4 mg
17-30	85:15 → 80:20	Λ02	2.6 mg
31-38	75:25	Λ03	2 mg
39-50	75:25 → 70:30	Λ04	6.6 mg
51-73	65:35 → 55:45	Λ05	51.4 mg
52-170	55:45 → 00:100	Λ06	28.2 mg
171	Lavado	Λ07	300 mg

La reunión $\Lambda 05$ presentó cristales blanquecinos en suspensión amorfos (3.5 mg), que al realizar un análisis por CCF (R.F.=0.6 hex:AcOEt:Ác. Fórmico 6:4:0.1) se observó una mancha única bajo luz UV, este compuesto se caracterizó por RMN 1D ^1H y ^{13}C (**espectro 1**, **espectro 2**), RMN 2D HSQC, HMBC, espectrometría de masas FAB⁺, y CG-EM. Caracterizando este como 6-metoxi-2benzoxazolinona (coixol).



- Cristal blanco con morfología de alfiler
- FM: $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$
- PM: 165.04 g/mol
- P.F.: 160°C
- R.f. : 0.7 (Hex:AcOEt:Ác. fórmico 6:4:0.1)

RMN ^1H (MeOD:CDCl₃, 500 MHz) δ 6.94 (*d*, 1H, *J* = 8.6 Hz), 6.85 (*d*, 1H, *J* = 2.4 Hz), 6.72 (*dd*, 1H, *J* = 8.6, 2.5 Hz), 3.77 (*s*, 3H).

RMN ^{13}C (MeOD:CDCl₃, 125 MHz) δ 156.30, 156.29, 144.70, 123.57, 109.61, 106.28, 96.70, 55.06

FABMS *m/z* [M+H]⁺: 165 g/mol

Los resultados del análisis por cromatografía de gases-EM de las reuniones $\Lambda 01$, $\Lambda 02$, $\Lambda 05$ a 1 mg/mL en hexano, pueden ser consultados en la sección de anexo 10.3 ($\Lambda 01$) y 10.4 ($\Lambda 02$) y en la sección 7.3.2.4.1 para $\Lambda 05$.

6.7.1.2 Huitlacoche Fresco.

Por otro lado, en el fraccionamiento cromatográfico de la fase de DCM del huitlacoche fresco (3 g) se usó 115 g de silica, (230-40 mesh ASTM, cas 7631-86-9, Merk) en una columna de 45-5.5 cm, con un gradiente de n-hexano: AcOEt (90:10 → 00:100). Recolectando fracciones de 25 mL cada uno, las cuales se concentraron con ayuda de un rotaevaporador y monitoreado por CCF se agruparon en 09 reuniones acorde a su homogeneidad según lo visto, ver Tabla 9.

Tabla 9. *Fraccionamiento cromatográfico fase de DCM del extracto de huitlacoche fresco.*

Fracciones	Sistema Hex:AcOEt	Reunión	Peso
01-120	90:10 → 88:12	Q01	107.4 mg
121-205	88:12 → 80:20	Q02	9.3 mg
206-286	80:20 → 70:30	Q03	4.7 mg
287-351	70:30 → 65:35	Q04	6.1 mg
352-401	65:35 → 55:45	Q05	7.9 mg
402-492	55:45 → 45:55	Q06	93.4 mg
493-570	45:55 → 30:70	Q07	152.9 mg
571-670	30:70 → 20:80	Q08	172.6 mg
671-720	20:80 → 00:100	Q09	57 mg

La reunión Q06 (93.4 mg), procedente del fraccionamiento de la fase DCM del HC, presentó cristales blanquecinos en suspensión amorfos, que al realizar un análisis por CCF (R.F.=0.6 hex:AcOEt:Ác. Fórmico 6:4:0.1) se observó una mancha única. Este compuesto fue identificado como el 6-metoxi-2-benzoxazolinona, aislado anteriormente de la reunión A05.

De las reunión Q01 a Q03 se prepararon muestras 1 mg/mL en hexano y Q04 a Q09 en DCM para analizarlos por cromatografía de gases. Los resultados que muestra la biblioteca NIST se pueden consultar en los anexos 10.5.

6.7.2 Fraccionamiento Secundario de las Fases de DCM

Determinadas reuniones obtenidas del fraccionamiento primario de las fases de DCM del extracto de huitlacoche cocido y del extracto de huitlacoche fresco se llevaron a un fraccionamiento secundario.

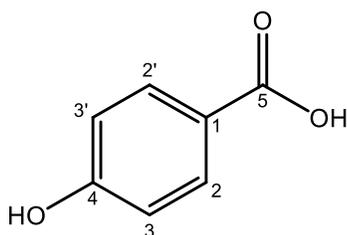
6.5.2.1 Huitlacoche Cocido: Reunión $\Lambda 05$.

La reunión $\Lambda 05$ (51.4 mg) de la fase de DCM del huitlacoche cocido se fraccionó mediante cromatografía en columna, se usó 2.2 g de silica, (230-40 mesh ASTM, cas 7631-86-9, Merk) empacada en una columna de 44.5·1.2 cm; la muestra se absorbió en 103 mg de silica y se usó un gradiente de n-hexano: AcOEt (90:10 \rightarrow 00:100). Se obtuvieron 120 fracciones de 10 mL cada una, colectándolas con un rotaevaporador, las cuales se congregaron en 8 reuniones en base al monitoreo por CCF, ver Tabla 10.

Tabla 10. Fraccionamiento cromatográfico reunión $\Lambda 05$ del extracto de huitlacoche cocido

Fracciones	Sistema Hex:AcOEt	Reunión	Peso
01-120	90:10 \rightarrow 88:12	$\Lambda 05$ -R01	6 mg
121-205	88:12 \rightarrow 80:20	$\Lambda 05$ -R02	1.7 mg
30-42	80:20 \rightarrow 70:30	$\Lambda 05$ -R03	18.1 mg
287-351	70:30 \rightarrow 65:35	$\Lambda 05$ -R04	12.8 mg
352-401	65:35 \rightarrow 55:45	$\Lambda 05$ -R05	6.4 mg
402-492	55:45 \rightarrow 45:55	$\Lambda 05$ -R06	6.2 mg
493-570	45:55 \rightarrow 30:70	$\Lambda 05$ -R07	5.4 mg
571-670	30:70 \rightarrow 20:80	$\Lambda 05$ -R08	3.9 mg

En la reunión $\Lambda 05$ -R03 se obtuvo un sólido de consistencia pastosa, se preparó una muestra de 1 mL/mg en acetona para su análisis por CG-EM, sugiriendo que es el ácido 4-hidroxibenzoico y se caracterizó por RMN 1D ^1H y ^{13}C , RMN 2D HSQC, HMBC.



- Sólido pastoso
- FM: $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$
- PM: 138.031694049 g/mol
- P.F.: 214.5 $^\circ\text{C}$
- R.f. : 0.7 (Hex:AcOEt:Ác. fórmico 6:4:0.1)

RMN ^1H (500 MHz, MeOD: CDCl_3) δ 7.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.7 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (150 MHz, MeOD: CDCl_3) δ 170.06, 163.1, 132.95, 122.73, 115.98

6.5.2.1 Huitlacoche Fresco: Reunión Q02.

La reunión Q02 (9.3 mg) de la fase de DCM del huitlacoche fresco se fraccionó mediante cromatografía en columna, empacada con sílica flash, eluyendo con un gradiente de n-hexano-AcOEt (100:00:00 → 00:00:100). Las 420 fracciones obtenidas de 10 mL cada una se concentraron y congregaron en 8 reuniones en base al monitoreo por CCF.

Tabla 11. Fraccionamiento cromatográfico reunión Q02 del extracto de huitlacoche fresco.

Fracciones	Sistema Hex:AcOEt	Reunión	Peso
01-60	100:00 → 98:12	Q02-V01	3.1 mg
61-123	95:05 → 90:10	Q02-V02	3.5 mg
124-182	90:20 → 84:16	Q02-V03	1.4 mg
183-240	84:16 → 80:20	Q02-V04	1.3 mg
241-256	76:24: → 76:24	Q02-V05	0.7 mg
257-302	76:24: → 67:33	Q02-V06	2.2 mg
303-343	67:33 → 50:50	Q02-V07	1.0 mg
344-420	50:50 → 00:100	Q02-V08	5.1 mg

Los resultados del análisis por cromatografía de gases acoplado a masas de la reunión V01 (1 mg/mL hexano) se describen en anexos 10.7.

6.5.2.1 Huitlacoche Fresco: Reunión Q09.

La reunión Q9 (57 mg) de la fase de DCM del huitlacoche fresco, se fraccionó mediante cromatografía en columna, empacada con sílica flash, eluyendo con un gradiente de n-hexano-AcOEt (95:00:00 → 00:00:100). Se obtuvieron 230 fracciones de 10 mL cada una, las cuales se agruparon en 10 reuniones en base al monitoreo por CCF.

Tabla 12. Fraccionamiento cromatográfico reunión Q09 del extracto de huitlacoche fresco

Fracciones	Sistema Hex:AcOEt	Reunión	Peso
01-32	95:05 → 93:07	Q09-S01	1.4 mg
33-65	93:07-90:10	Q09-S02	1.5 mg
66	90:10	Q09-S03	12.8 mg
67-110	90:10 → 84:16	Q09-S04	3.7 mg
111-147	80:20 → 75:25	Q09-S05	5.2 mg
148-173	75:25 → 30:70	Q09-S06	1.8 mg
174-197	30:70 → :15:85	Q09-S07	16.1 mg
198-230	15:85 → 00:100	Q09-S08	4.3 mg

Mediante CG-EM se analizó una muestra de 1 mg/mL en hexano de la reunión S04 , cuyos resultados se encuentran para su consulta en anexos 10.8.

6.8 Microencapsulación de Extractos

6.8.1 Alginato de Sodio

6.8.1.1 Preparación de las Soluciones.

El cloruro de calcio (grado comestible, marca “mi granero”) se utilizó como agente quelante preparado una solución al 5% (se pesaron 5 g en 100 mL de agua destilada).

Para la solución de los extractos etanólicos de huitlacoche fresco y cocido se prepararon a concentraciones de 1%, 1.8% y 2.5% pesando 100 mg, 180 mg y 250 mg respectivamente y diluyéndolos en 10 mL de aguas destilada.

6.8.1.2 Desarrollo del Método.

Para la preparación de la formulación I, la solución de extracto de huitlacoche (E.H.) al 1% en agitación se adiciona lentamente 100 mg de alginato de sodio (A.S.). Posteriormente, para generar los encapsulados, mediante una bomba peristáltica se adicionó la solución de A.S.- E.H. sobre 100 mL de la solución de cloruro de calcio (CaCl₂) al 5%.

Una vez formados, se filtró con ayuda de un colador y se realizó varios lavados con agua destilada suficiente, posterior a ello se quitó el exceso de humedad para así colocarlos en una caja Petri para su correcto etiquetado y para almacenarlas en refrigeración a 4°C

Este procedimiento se siguió para los demás formulaciones (II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) empleadas para la encapsulación de extracto de huitlacoche fresco como cocido, ver tabla 13.

Tabla 13. *Formulaciones para los encapsulados con alginato de sodio*

Material	Formulación						
	I	II	III	X	XI	XII	
Extracto etanólico de huitlacoche 1% ^A	100 mg						
Alginato de Sodio	^B 100 mg	^C 150 mg	^D 200 mg	^B 100 mg	^C 150 mg	^D 200 mg	
CaCl ₂ 5%	100 mL						
	IV	V	VI	XIV	XV	XVI	
Extracto etanólico de huitlacoche 1.8 % ^A	180 mg						
Alginato de Sodio	^B 100 mg	^C 150 mg	^D 200 mg	^B 100 mg	^C 150 mg	^D 200 mg	
CaCl ₂ 5%	100 mL						
	VII	VIII	IX	XVII	XVIII	XIX	
Extracto etanólico de huitlacoche 2.5 % ^A	250 mg						
Alginato de Sodio	^B 100 mg	^C 150 mg	^D 200 mg	^B 100 mg	^C 150 mg	^D 200 mg	
CaCl ₂ 5%	100 mL						

^Aen 10 mL de agua, Alginato de sodio ^B1 % (100mg), ^C2% (180 mg), ^D2% (200 mg)

El diagrama de flujo se puede consultar en anexos 10.9

6.8.2 Quitosano

6.8.2.1 Preparación de las Soluciones.

La solución de ácido acético glacial (Cas 64-19-7, J. T. Baker™) al 1%(v/v) se preparó al adicionar 1 mL de ácido a 149 mL de agua destilada.

Las soluciones de quitosano (CAS 9012-76-4, Sigma-Aldrich) al 0.05% y 0.01%v (p/v), se realizaron pesando 50 mg y 10 mg para ser añadidas en agitación constante por 20 h. (Parrilla Heidolph MR-3001-K) en la solución de ácido acético glacial al 1%(v/v).

Esta solución de quitosano se ajustó a un pH=5 haciendo uso de una solución de hidróxido de sodio (CAS 1310-73-2) 1N (pesando 400 mg de NaOH y diluyéndolo en 10 mL de agua), esto con la ayuda de un potenciómetro (Hamilton, Arc™ View Handheld).

Para la preparación de las soluciones de los extractos de huitlacoche al 1%, 1.8 % y 2.5% se emplearon 100 mg, 180 mg, 250 mg de cada uno de los extractos disueltos en 40 mL de EtOH:Agua (7:3).

6.8.2.2 Desarrollo del Método.

Se siguió la metodología descrita por (Chandirika et al., 2018) con algunas modificaciones.

A la solución del extracto de huitlacoche se adicionó al sistema 10 µL de *tween* 80, dejándolo en agitación constante por 30 min.

Una vez pasado este tiempo, empleando una bomba peristáltica y colocando la aguja situada dos centímetros por encima de la superficie se adicionó por goteo 5 mL de la solución de quitosano sobre la solución E.H/*Tween* 80 la cual se encontraba en agitación (500 rpm) por 45 min.

Posterior a ello, la solución final que contiene las microparticulas de quitosano se vertieron en un tubo falcon para llevarla a centrifugación (Labnet Z100A) por 30 min a 2000 rpm, se enjuagó tres veces con agua destilada; tomando 1.5 mL en un tubo *Eppendorff* para llevarlo a ultracongelación -80 °C para después liofilizarlo en un equipo Thermo Micro Modulyo 115 Freeze Dryer System (-45°C, 1mBar).

Al término de la liofilización se almacenan en un desecador hasta su análisis por microscopía. Este procedimiento se aplicó para la realización de la microencapsulación del

extracto de huitlacoche cocido y extracto de huitlacoche fresco en sus distintas formulaciones (II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII), ver tabla 14.

Tabla 14. *Formulaciones para los encapsulados con quitosano*

Material	Formulación			
	Huitlacoche cocido		Huitlacoche fresco	
	I	II	VII	VIII
Extracto etanólico de huitlacoche 1%	^A 100 mg	^A 100 mg	^A 100 mg	^A 100 mg
Tween 80	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Quitosano	^B 5 mL	^C 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL
	III	IV	IX	X
Extracto etanólico de huitlacoche 1.8%	^A 180 mg	^A 180 mg	^A 180 mg	^A 180 mg
Tween 80	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Quitosano	^B 5 mL	^C 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL
	V	VI	XI	XII
Extracto etanólico de huitlacoche 2.5%	^A 250 mg	^A 250 mg	^A 250 mg	^A 250 mg
Tween 80	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Quitosano	^B 5 mL	^C 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL

^Aen 10 mL de agua; ^BQuitosano 0.01%; ^CQuitosano 0.05%

El diagrama de flujo se puede consultar en la anexos 10.9

6.8.3 Quitosano-Alginato-Extractos Etanólicos Huitlacoche

6.8.3.1 Preparación de las Soluciones.

Para la preparación de la solución de quitosano, se siguió la metodología descrita en la sección anterior (6.8.2 Quitosano).

Las soluciones de los extractos de huitlacoche cocido y fresco, se emplearon 100 mg, 180 mg, 250 mg de cada uno y se disolvieron en 40 mL de EtOH:Agua (7:3).

6.8.3.2 Desarrollo del Método.

La microencapsulación Quitosano-Alginato-Extractos Etanólicos Huitlacoche se realizó acorde a lo descrito por (Hosseini & Varidi, 2021) con ciertas modificaciones.

Se adicionó lentamente 150 mg de alginato de sodio (CAS 9005-38-3, Sigma-aldrich) a la solución de extracto de huitlacoche al 1% y se dejó en agitación 15 min a <100 rpm, después de eso, se añade 1.5 mL de solución de CaCl₂ al 5% a la solución de A.S.- E.H para posteriormente añadir 5 mL de solución de quitosano al 0.01%.

Después del tiempo de inyección, la solución se agitó durante media hora para completar la reacción. Luego, la mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 30 min, y luego, el gel se enjuaga abundantemente tres veces con agua destilada; tomando una muestra de 1.5 mL en tubos *Eppendorf* y llevarlo a ultracongelación -80 °C para después liofilizarlo en un equipo Thermo Micro Modulyo 115 Freeze Dryer System (-45°C, 1mBar).

Una vez liofilizado las muestras, estas se almacenan en un desecador hasta su análisis por microscopia.

Tabla 15. *Formulaciones para los encapsulados con quitosano-alginato de sodio*

Material	Formulación							
	Huitlacoche cocido				Huitlacoche fresco			
	I	II	III	IV	XIII	XIV	XV	XVI
Extracto de huitlacoche 1%	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
Alginato de Sodio	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg
CaCl 5%	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Quitosano	^B 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL	^C 5 mL	^B 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL	^C 5 mL
	V	VI	VII	VIII	XVII	XVIII	XIX	XX
Extracto de huitlacoche 1.8%	180 mg	180 mg	180 mg	180 mg	180 mg	180 mg	180 mg	180 mg
Alginato de Sodio	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg
CaCl 5%(mL)	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Quitosano	^B 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL	^C 5 mL	^B 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL	^C 5 mL
	IX	X	XI	XII	XXI	XXII	XXIII	XXIV
Extracto de huitlacoche 2.5%	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg
Alginato de Sodio	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg	150 mg	200 mg
CaCl 5%(mL)	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Quitosano	^B 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL	^C 5 mL	^B 5 mL	^B 5 mL	^C 5 mL	^C 5 mL

^BQuitosano 0.01%, ^CQuitosano 0.05%

El diagrama de flujo se puede consultar en anexos 10.9

6.9 Microscopía Estereoscópica

Por cada formulación de microcápsulas de alginato (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) se seleccionaron un promedio de 25 cápsulas colocándolas en una tapa de caja *Petri* grande para ser analizadas en un esteromicroscopio (Olympus mvx10) con un aumento de 10x.

La visualización de estos encapsulados y la captura de sus imágenes fueron tomadas con el software SpinView 2.3.0.77, las imágenes se obtuvieron en escala de colores y se almacenaron en formato TIFF con una resolución de 1920 x 1200 píxeles.

6.10 Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM)

Las muestras quitosano y quitosano alginato se colocaron en stubs de aluminio con cinta conductora de cobre de doble cara y fueron observadas directamente bajo un Microscopio electrónico de barrido ambiental (Zeiss, EVO LS10, Alemania) con un voltaje de aceleración de 30 Kv y una presión de 30 Pa de vapor de agua. Se utilizó un detector de electrones retrodispersados (NTS BSD), las imágenes se obtuvieron en escala de grises y se almacenaron en formato TIFF con una resolución de 1024 x 768 píxeles.

6.11 Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)

Cada muestra se montó en cubreobjetos de vidrio y se observó mediante un CLSM (Carl Zeiss, LSM800, Alemania) acoplado a una AxioCam HD color (Carl Zeiss, Modelo 305, Alemania). Se utilizó el software ZEN (Zeiss efficient navigation) versión 2.6 Blue edition. Se adquirieron las micrografías con objetivo N – Achroplan de 5 X/0.15 y se identificó autofluorescencia mediante la función “Lambda” en 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm. Todas las micrografías se almacenaron en formato TIFF con una resolución de 2048 x 2048 píxeles a 300 ppp.

6.12 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras de quitosano se colocaron en una celda de cobre y fueron observadas directamente bajo un Microscopio electrónico de transmisión (JEOL, JEM-2100, Alemania) acoplado a una CCD digital (Gatán, modelo SC200). Con un voltaje de aceleración de 200 Kv, las imágenes se obtuvieron en escala de grises y se almacenaron en formato JPG con una resolución de 590 x 590 píxeles.

6.13 Análisis de Imágenes Estáticas de Microscopía y Estereoscopia

Para el procesamiento de las imágenes obtenidas en las diferentes microscopias empleadas (ESEM, CLSM, TEM) y estereoscopia se usó el software ImageJ para la medición de los diámetros de los vehículos, a continuación en la Tabla 16 se muestran los equivalentes de unidad/píxeles

Tabla 16. *Equivalencia de Píxeles/ Unidad por técnica de microscopía*

Tipo de microscopía	Distancia conocida	Píxeles	Escala
Microscopia Estereoscópica	1 mm	111.5045	111.504 $\frac{\text{píxeles}}{\text{mm}}$
Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM)	30 μm	54.125	1.80 $\frac{\text{píxeles}}{\mu\text{m}}$
	10 μm	44.8757	4.487 $\frac{\text{píxeles}}{\mu\text{m}}$
Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)	100 μm	160.0031	1.60 $\frac{\text{píxeles}}{\mu\text{m}}$
	100 μm	93.7513	0.937 $\frac{\text{píxeles}}{\mu\text{m}}$
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	10 nm	26.0001	2.60 $\frac{\text{píxeles}}{\text{nm}}$

6.14 Análisis estático ANOVA

El análisis estadístico de los datos de los tamaños de los encapsulados de alginato de sodio – extracto de sodio se realizó con el software GraphPad Prism 8.0.1. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar la significación estadística. Las diferencias significativas entre las muestras se identificaron mediante la prueba de Turkey con un nivel de confianza del 95 % ($P < 0,05$).

7. Resultados y Discusión

7.1 Rendimientos de Extractos y Fases de Bipartición

El porcentaje de rendimiento entre el extracto etanólico de huitlacoche fresco (E.E.H.F.) y el extracto etanólico de huitlacoche cocido (E.E.H.C.) fue similar, contando con un 3.34 % para el E.E.H.F. y del 3.44 % para el E.E.H.C.; por otro lado, en cuanto a las fases de baja a alta polaridad (fase hexánica, fase de DCM, fase hidroalcohólica) de los extractos etanólicos, el rendimiento de la fase hexánica fue similar para ambos casos, en el caso de la fase de DCM del huitlacoche fresco tuvo un rendimiento del 1.74 % en contraste con el 0.26 % del huitlacoche cocido, por último, en la fase hidroalcohólica del E.E.H.C. tuvo un porcentaje del 41.53% siendo menor al 55.93% del E.E.H.F. del se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Rendimiento de las fases de los extractos de huitlacoche

	Extracto		Fase hexánica		Fase DCM		Fase hidroalcohólica	
	H.F.	H.C.	H.F.	H.C.	H.F.	H.C.	H.F	H.C.
Rendimiento	3.34 % (266.9 g)	3.44 % (241 g)	0.33 % (0.72 g)	0.67 % (1.48 g)	1.74% (3.83 g)	0.26% (0.58 g)	55.93% (123.0 g)	41.53 % (91.36 g)

H.F = extracto etanólico de huitlacoche fresco, H.C = extracto etanólico de huitlacoche cocido

Mediante cromatografía en capa fina (CCF) se analizó el extracto etanólico de huitlacoche fresco y el extracto etanólico de huitlacoche cocido, ver Figura 10A, además de las fases obtenidas a partir de la bipartición de estos extractos, ver Figura 10B, 10C, 10D.

Lo apreciado en UV a una longitud de onda corta ($\lambda=254$ nm) en la aplicación de huitlacoche fresco (H.F.) en CCF observamos una mancha definida con un Rf de 0.61. Por otro lado, al observar esta misma placa a una longitud de onda larga ($\lambda=366$ nm) apreciamos una mayor cantidad de manchas tanto en H.F., la primera de ellas una mancha verde que tiene un Rf de 0.59, seguido de una mancha azul con un Rf casi similar de 0.57. Por último, cerca del punto de aplicación observamos dos manchas pequeñas en un color verde con un Rf de 0.23 y una color azul con un Rf d 0.20.

En las fases de menor polaridad (hexánicas) de ambos extractos (Figura 10B) se observó un contenido metabólico similar, a una longitud de onda corta en la aplicación de H.F. se aprecian al menos 2 manchas definidas, la primera de ellas coincide con la mancha presente en la aplicación de huitlacoche cocido (H.C.) teniendo un Rf de 0.76.

La siguiente mancha únicamente se aprecia en H.F. con un Rf de 0.67 a esta longitud de onda, aunque, al observar la placa en onda corta también hay una mancha fluorescente en las dos aplicaciones teniendo un Rf común de 0.57. En el caso del H.F. se logró apreciar una mancha verde con un Rf de 0.68.

Al colocar el revelador de ácido sérico se apreciaron dos manchas amarillas con una pequeña mancha negra, su Rf en ambas aplicaciones es de 0.13. Posteriormente al calentado de la placa, se revelan las manchas vistas en onda corta, pero se adicionan 3 más por debajo de estas, teniendo un Rf de 0.51, 0.47 y 0.39.

Para las fases de DCM de ambos extractos (Figura 10C) se observó un contenido metabólico similar, al observar la placa a una longitud de onda de 254 nm se aprecia una mancha ancha para ambos casos teniendo un Rf de 0.68, cuando se aplica el sulfato sérico se aprecian dos manchas de color negro con un contorno amarillo, dichas manchas tienen un Rf de 0.76. Posterior al calentamiento, se apreció una mancha definida en el H.C. teniendo un Rf de 0.96.

Por último, el análisis por cromatografía en capa fina de las fases hidroalcohólicas se aprecian en la Figura 10D, al observar la placa en onda corta de 254 nm se observa una mancha definida para ambos casos teniendo un Rf de 0.90, Posterior a la aplicación del revelador y someterlo a un breve calentamiento, se apreció una mancha definida en el H.F. teniendo un Rf de 0.71.

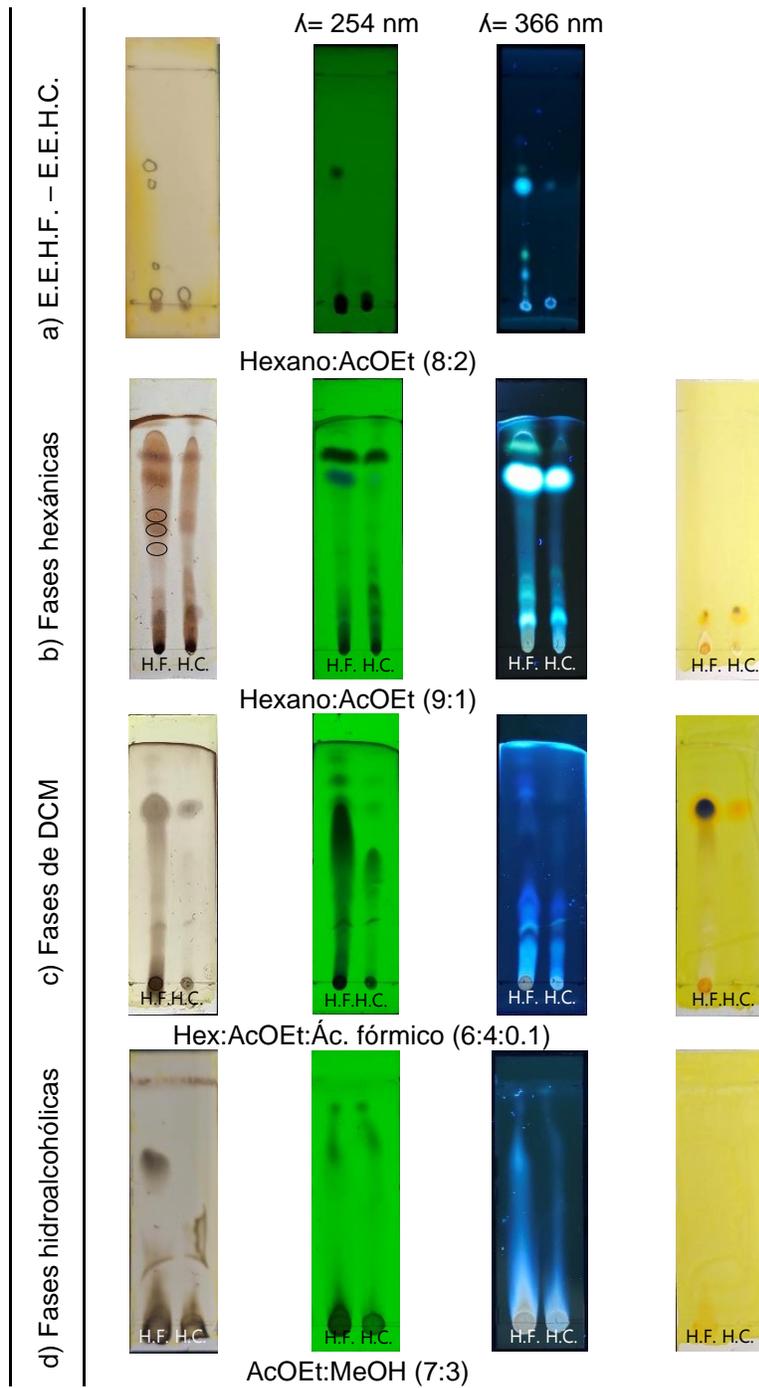
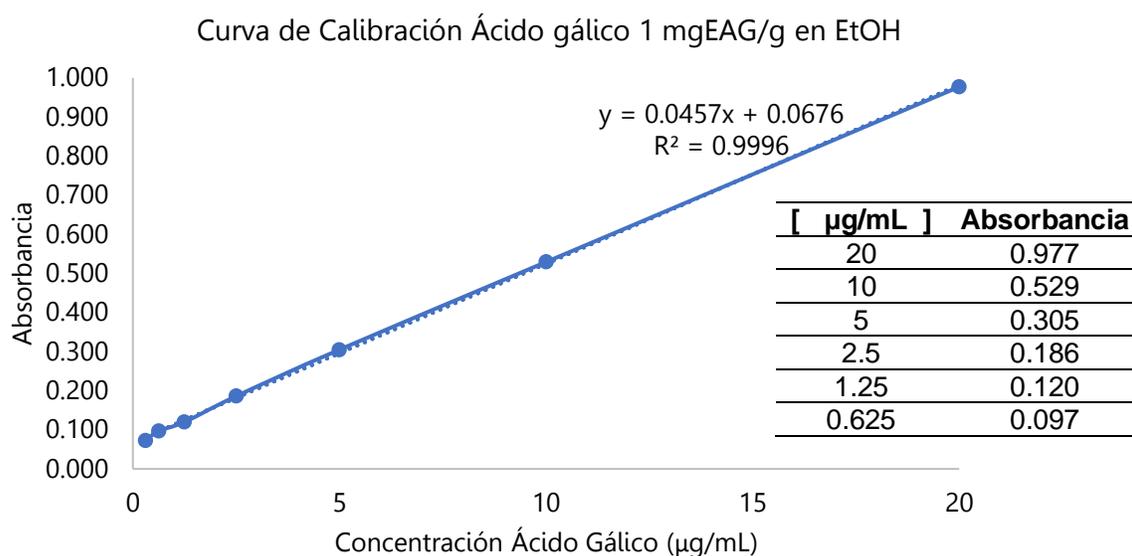


Figura 10. Placas de CCF: a) Extractos etanólicos, b) Fases hexánicas, c) fases de DCM, d) fases hidroalcohólicas

7.2 Análisis Químico de los Extractos Etanólicos de Huitlacoche

7.2.1 Cuantificación de Polifenoles Totales

La cuantificación de polifenoles totales de los extractos se hizo mediante el método de Folin-Ciocalteu. En la gráfica 1, se muestra la curva de calibración de ácido gálico que se utilizó como referencia y obtuvo la ecuación de la recta $y = 0.0457x + 0.0676$ con una $R^2 = 0.9996$.



Gráfica 1. Curva de calibración de ácido gálico para el ensayo de Folin-Ciocalteu.

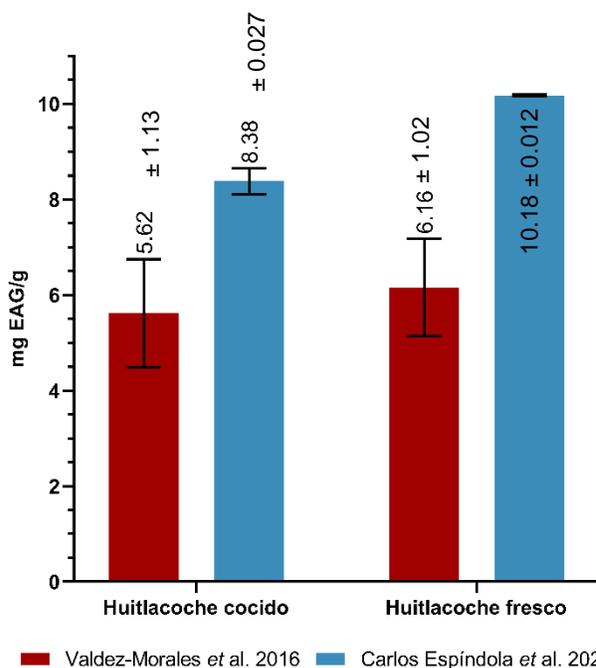
Ya realizada la curva de calibración y teniendo la ecuación de la recta se cuantificaron los polifenoles presentes en los extractos, en el caso del extracto etanólico del huitlacoche fresco se determinó una concentración de $10.18 \frac{mgEAG}{mL}$, en su contraparte el tratamiento en cocción posee $8.38 \frac{mgEAG}{mL}$ (tabla 18).

Tabla 18. Resultados de cuantificación de polifenoles para los extractos etanólicos de huitlacoche

	Absorbancia	Concentración		
	[A]	$\frac{\mu g}{mL}$	$\frac{mg}{mL}$	$\frac{mgEAG}{g}$
Huitlacoche Fresco	0.53	10.18	0.0102	10.18 ± 0.012
Huitlacoche Cocido	0.45	8.38	0.0084	8.38 ± 0.027

Acorde a lo reportado en la literatura estos datos pueden ser contrastados con el trabajo de (S. López et al., 2017) al ser extractos etanólicos de huitlacoche en tratamientos similares, reportando un total de contenido polifenólico para el E.E.H.F. y E.E.H.C. no concentrado de $49.6 \pm 0.02 \frac{\mu\text{gEAG}}{\text{mL}}$ y $70.9 \pm 0.1 \frac{\mu\text{gEAG}}{\text{mL}}$ respectivamente, no obstante, cuando el extracto de H.C. y H.F. están concentrados para el caso del extracto etanólico de huitlacoche cocido de $0.183 \frac{\text{mgEAG}}{\text{mL}}$ y $0.161 \frac{\text{mgEAG}}{\text{mL}}$ siendo estas concentraciones menores a las del presente trabajo.

En el caso particular de (Valdez-Morales et al., 2016) el *U. maydis* tuvo condiciones de tratamiento similares al nuestro, donde, como disolvente se usó metanol para la maceración, sus resultados muestran para el extracto metanólico de huitlacoche fresco (E.M.H.F.) una concentración $616.2 \pm 101.74 \frac{\text{mgEAG}}{100\text{g}}$ ($6.16 \pm 1.02 \frac{\text{mgEAG}}{\text{g}}$) y para el extracto metanólico de huitlacoche cocido (E.M.H.C.) $562.1 \pm 112.85 \frac{\text{mgEAG}}{100\text{g}}$ ($5.62 \pm 1.13 \frac{\text{mgEAG}}{\text{g}}$) por lo que hay una diferencia de $4.02 \frac{\text{mgEAG}}{\text{g}}$ entre los E.E.H.F. – E.M.H.F. y $2.76 \frac{\text{mgEAG}}{\text{g}}$ entre los E.E.H.C. – E.M.H.C, ver gráfica 2.



Gráfica 2. Comparación de polifenoles totales para Extracto etanólico y metanólico de huitlacoche cocido y fresco

7.2.2 Detección de Polifenoles Mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia

Los cromatogramas obtenidos del estudio del extracto etanólico de huitlacoche cocido (E.E.H.C.) y huitlacoche fresco (E.E.H.F.) con una lectura de 270 nm en el detector UV-Vis, se presentan en la Figura 11.

Omitiendo aquellos picos presentes en el blanco (MeOH:Agua), (Figura 11A), de los cromatogramas de los extractos; para E.E.H.F se detectó 1 pico, (Figura 11B) y para E.E.H.C., (Figura 11C), se cuantificaron 3 picos.

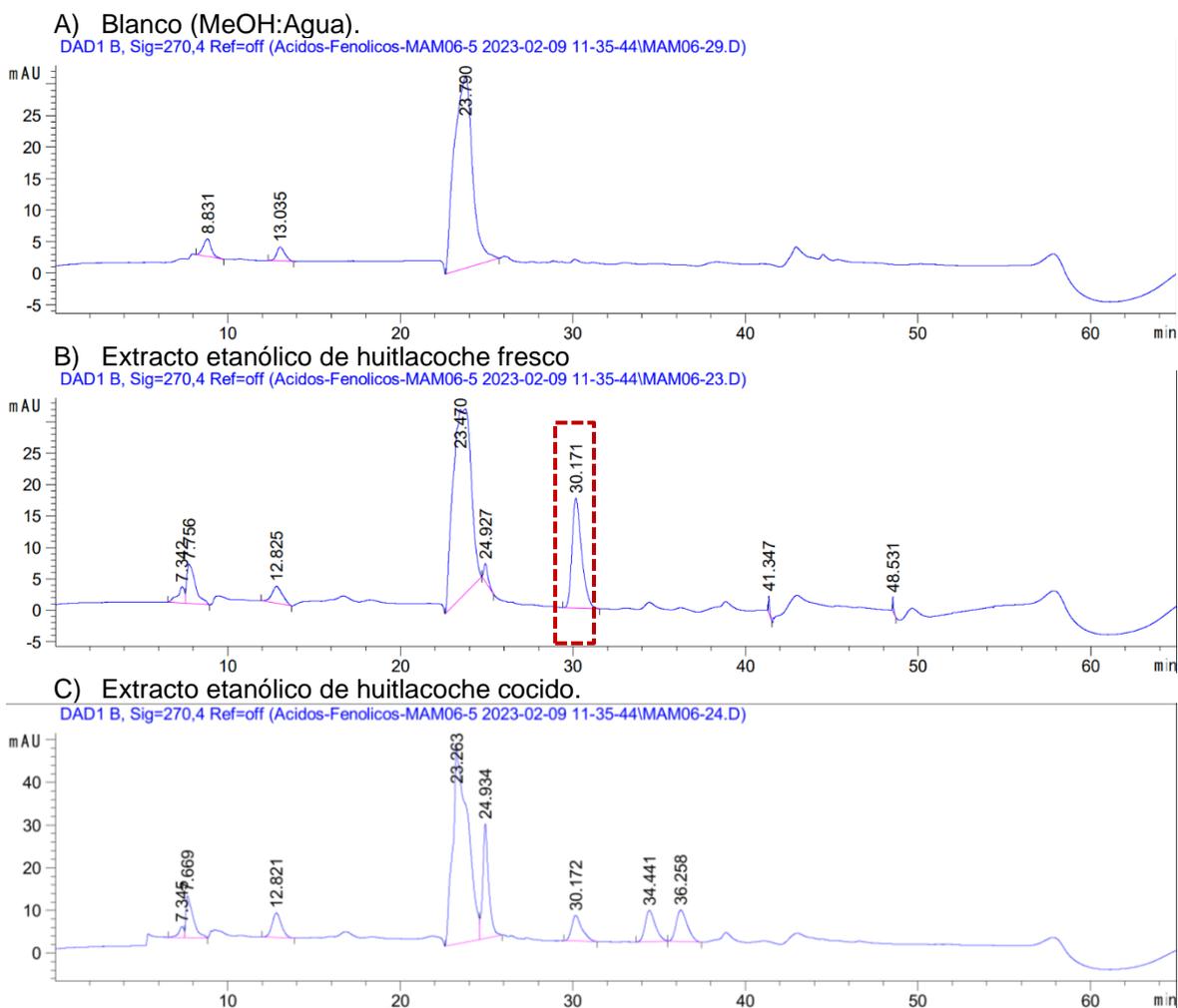


Figura 11. Cromatogramas a $\lambda = 270$ nm del extracto etanólico de a) huitlacoche fresco y b) Huitlacoche Cocido.

Acorde a la comparación de los tiempos de retención y sus espectros de UV de los estándares, el ácido siríngico ($t_R = 34.505$ min) coincide con el pico en 30.171 min del E.E.H.C. En la Tabla 19, se muestran los tiempos de retención de los picos y su porcentaje de área.

Tabla 19. *Tiempos de retención de los picos detectados a $\lambda = 270$ nm para el Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (E.E.H.F.) y Huitlacoche Cocido (E.E.H.C.)*

E.E.H.F			E.E.H.C		
T_r	λ_{max}	Área	T_r	λ_{max}	Área
[min]	[nm]	%	[min]	[nm]	%
7.342	-	2.1197	7.345	-	5.7627
7.756	-	6.4869	12.821	264	4.4620
12.825	-	3.4593	23.263	248	57.4218
23.470	260	65.4820	24.934	260	13.1477
24.927	-	1.4302	30.172	255	5.1421
30.171	-	20.3573	34.441	260	6.1614
41.347	-	0.3577	36.258	265	6.8003
48.531	-	0.3068			

7.3 Análisis Químico de las Fases Obtenidas Mediante Bipartición

7.3.1 Identificación de Metabolitos de la Fases Hexánicas

En el cromatograma del análisis por CG-EM de la reunión fase hexánica de huitlacoche cocido (H.C.), (Figura 12A), se detectaron 53 picos dentro de un rango 12 y 42 minutos con al menos 3 picos con mayor abundancia. Donde sólo el 69.81% de los picos tiene un score $\geq 80\%$.

Para el extracto etanólico del huitlacoche fresco (H.F.), (Figura 12B), se detectaron 41 picos que se encuentran en un intervalo de tiempo entre 18 y 42 min. y 85.36% de ellos superan el 80% de score en la biblioteca NIST; por otro lado, estos cromatogramas sugieren que existe un contenido metabólico similar, pero este difiere en cuanto a abundancia.

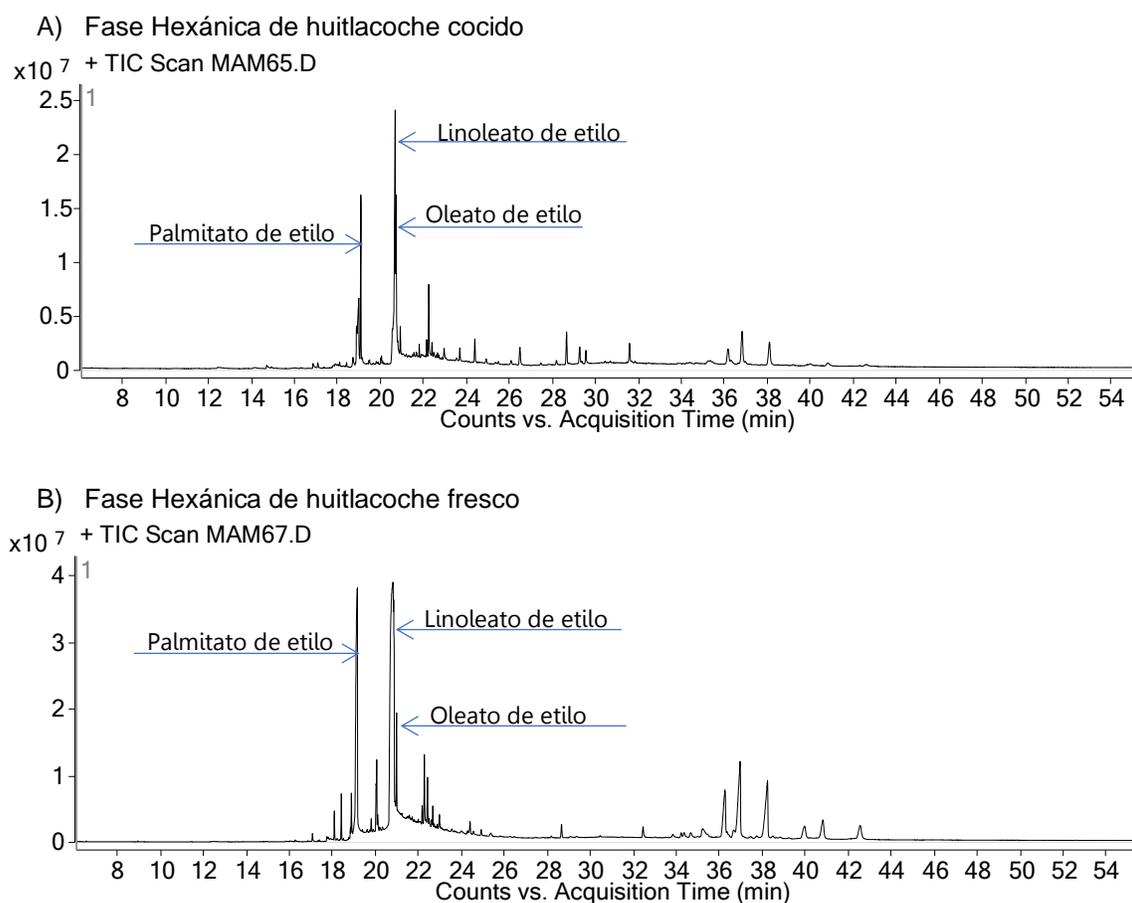


Figura 12. Cromatogramas de las fases de hexano del extracto etanólico del a) huitlacoche cocido y b) huitlacoche fresco .

Los compuestos identificados con una abundancia superior al 1% se enlistan en la tabla 20; observamos que los compuestos de tipo ácido graso esterificado son los más predominantes enseguida de los esteroides.

Tabla 20. Compuestos presentes en la fase hexánica de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco

		ÁCIDOS GRASOS							
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área		
Huitlacoche cocido	01	Linoleato de etilo	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	95.36	308.3	67.1	20.680	11.33%	
	02	Oleato de etilo	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	96.72	310.3	55.1	20.72	5.30%	
	03	Palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	96.19	284.3	88.1	19.084	4.37%	
	04	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	78.84	282.3	101.1	22.244	2.24%	
	05	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	87.08	301.2	65.1	25.282	1.50%	
	06	(E)-9-palmitoleato de etilo	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	82.76	282.3	149	18.884	1.17%	
	07	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	87.96	280.2	55.1	20.549	1.15%	
		ESTEROLES							
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área		
08	Espinasterona	C ₂₉ H ₄₆ O	88.05	410.4	55.1	36.8195	2.52%		
09	Gama.-sitostenona	C ₃₀ H ₅₀ O	86.18	412.4	124.1	38.0975	2.00%		
10	β-Ergostenona	C ₂₈ H ₄₆ O	80.45	398.4	124.1	36.173	1.32%		
		TRITERPENOS							
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área		
11	Escualeno	C ₃₀ H ₅₀	93.67	410.4	69.1	28.6585	1.33%		
		ÁCIDOS GRASOS							
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área		
Huitlacoche fresco	01	Linoleato de etilo	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	96	308.3	67.1	20.785	29.84%	
	03	Palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	96.5	284.3	88.1	19.143	17.17%	
	02	Oleato de etilo	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	94.75	310.3	55.1	20.818	8.22%	
	12	Ácido araquídico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	80.11	312.3	55.1	20.983	2.68%	
	13	Estearato de etilo	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	92.1	312.3	88.1	20.963	2.56%	
	14		C ₁₉ H ₃₄ O ₂	81.93	294.3	88.1	20.056	2.47%	
	15	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	82.94	282.3	101.1	22.277	2.16%	
	16	ND				55.1	40.794	2.11%	
	04	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	81.01	282.3	101.1	22.263	1.95%	
	17	ND				55.1	40.827	1.83%	
	07	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	89.96	280.2	55.1	21.226	1.70%	
	18	Ácido gondoico	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	87.36	310.3	55.1	22.414	1.37%	
	19	ND				414.4	39.96	1.37%	
			ESTEROLES						
	Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
	08	Espinasterona	C ₂₉ H ₄₆ O	90.26	410.4	55.1	36.931	7.35%	
	09	Gama.-sitostenona	C ₂₉ H ₄₈ O	90.68	412.4	124.1	38.206	6.06%	
	10	β-Ergostenona	C ₂₈ H ₄₆ O	88.47	398.4	124.1	36.235	4.37%	
	20	Citrost-7-en-3-ol	C ₃₀ H ₅₂ O	80.21	428.4	428.4	42.528	1.52%	
21	4-Vinylcholestan-3-ol	C ₂₉ H ₅₀ O	80.16	414.4	414.4	39.933	1.45%		

*Se enlistan aquellos compuestos con un área ≥ 1%

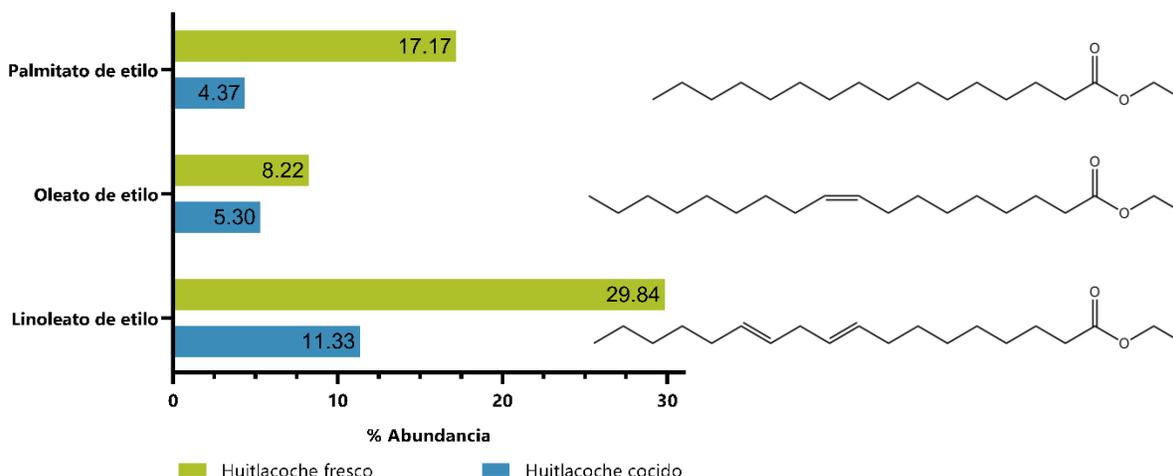
**N.D.: No detectado

***¹⁴10,13-éster metílico del ácido octadecadienoico

Dentro de estos ácidos grasos, iniciando con el éster etílico del ácido linoleico (linoleato de etilo) **01** que para el H.C. es del 11.33 % mientras que en su contraparte en el H.F. es del 32.1%. Dentro de su bioactividad, se muestran reportes antiinflamatorios, antidiabéticos, (S. Y. Park et al., 2014; Rayar & Manivannan, 2015)

Lo sigue, el oleato de etilo **02** distribuyéndose con un 05.30% en el H.C. y el 08.67% en el H.F. sus evaluaciones biológicas muestran actividad antimicrobiana, antidiabética, (Akin-osanaiye et al., 2011; Kemp et al., 2008).

Y el tercer ácido graso esterificado es el éster etílico del ácido hexadecanoico (palmitato de etilo) **03** para H.C. (04.37%) | H.F. (18.34%). Al igual que los otros metabolitos se reporta una potencial actividad antiinflamatoria (Saeed et al., 2012) y actividad antiobesidad y antihiperlipidémico (Abdur Rashid Mia et al., 2023).



Gráfica 3. Ácidos grasos más abundantes en la fase hexánica de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.

Como se observa en la gráfica 3, este tipo de metabolitos tiende a tener una mayor predominancia en el huitlacoche fresco que en el hongo con tratamiento térmico. Dicha tendencia puede ser atribuida al efecto que se da al someter los lípidos a altas temperaturas que deriva en su degradación, oxidación, polimerización y condensación para generar los correspondientes ácidos grasos, hidroperóxidos, aldehídos, (D. Wang et al., 2023), así como la pérdida de compuestos volátiles.

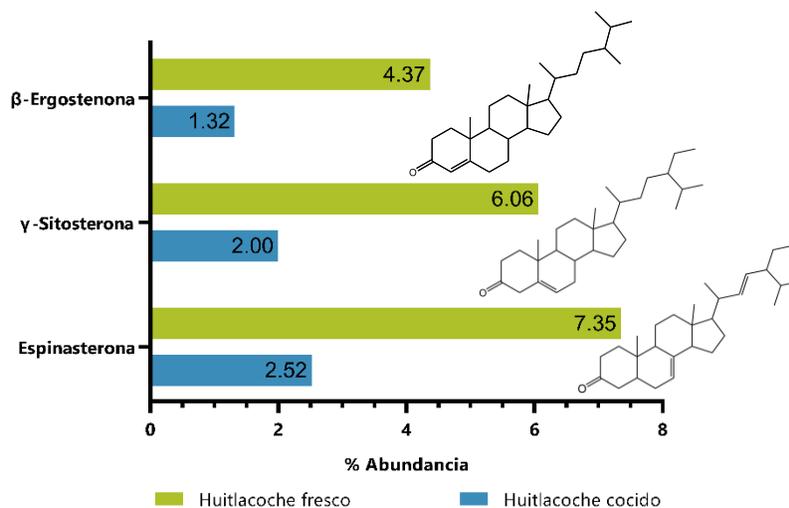
Ahora bien, los grupos de investigación (Aydoğdu & Gölükçü, 2017; Valdez-Morales et al., 2016; Valverde & Paredes-López, 1993) han reportado para el huitlacoche a estos ácidos grasos en su forma no esterificada.

Siguiendo con este análisis, el segundo tipo de compuestos presentes son los microesteroles como lo es la espinasterona, la Γ -sitostenona y la β -Ergostenona. Esta familia de metabolitos, ha generado un interés debido a los beneficios que tiene para la salud humana, que va desde su propiedad antioxidante y su capacidad de reducir los niveles de colesterol, (Veza et al., 2020),

Dicho esto, la espinasterona **08** tiene un porcentaje de abundancia del 2.52% en H.C. y del 7.35% % en H.F. del lado de su actividad biológica tiene actividad antiproliferativa (Meneses-Sagrero et al., 2017) y actividad alelopática (Ripardo Filho et al., 2012).

El siguiente esteroles es la Γ -sitostenona **09** con un 2.00% y 6.23% para H.C. y H.F. respectivamente, en cuanto a su bioactividad se ha reportado actividad antiproliferativa (Meneses-Sagrero et al., 2017), (Oh et al., 2021) sugiere que posee actividad antiobesidad.

Con 4.59% el *4-Campestene-3-one* (β -Ergostenona) **10** se ha encontrado en el H.F. y con abundancias muy similares en el H.C. se identificaron a este mismo metabolito (1.32%).



Gráfica 4. Micoesteroles más abundantes en la fase de DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.

Por otro lado, analizando los datos correspondientes a la gráfica 4, los microesteroles se encuentran en mayor proporción en el huitlacoche fresco teniendo una diferencia de 4 puntos porcentuales, esta disimilitud puede ser reflejo de su degradación y formación de oxisteroles (Barriuso et al., 2012). Dentro los esteroides que fueron reportados por (S. López et al., 2017) y (Valdez-Morales et al., 2016) como el ergosterol, sitoesterol o estigmasterol se han identificado en estas fases pero con una abundancia menor a la de 1%.

7.3.2 Identificación de Compuestos en la Fases de Diclorometano

Las fases de diclorometano del H.C. y H.F. se estudiaron mediante técnicas cromatográficas como cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía en columna y por técnicas espectroscópicas como RMN.

7.3.2.1 Análisis del Perfil Micoquímico de las Fases de DCM por CG-EM.

El estudio de las fases de DCM por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de ambos tratamientos del huitlacoche, dio pie a la detección de 17 picos en el cromatograma de H.C. y 40 picos para H.F., (Figura 13), en su conjunto 30 picos poseen un porcentaje de coincidencia en la biblioteca por arriba del 80%.

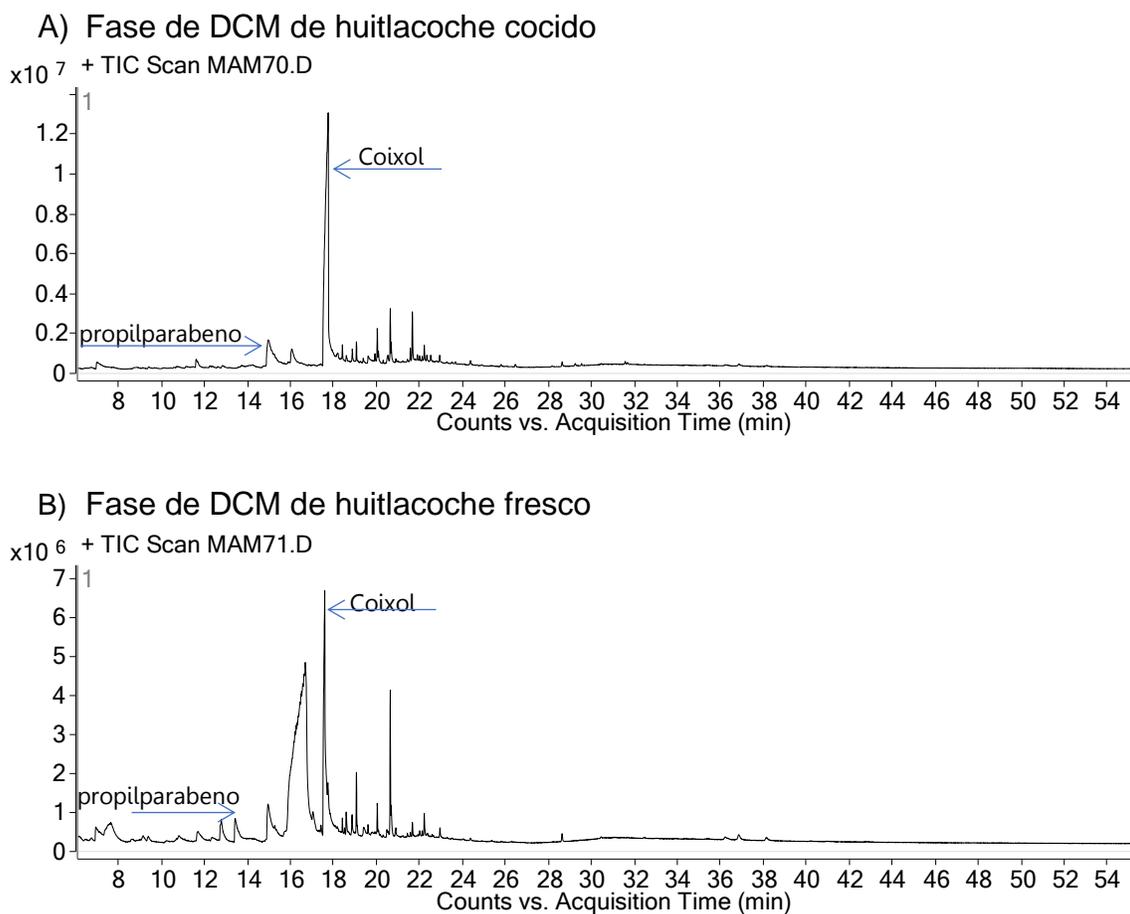


Figura 13. Cromatogramas de las fases hexánicas del extracto etanólico del a) huitlacoche cocido y b) huitlacoche fresco.

El procesamiento de datos en la biblioteca NIST sugieren la presencia de compuestos en estas fases como ácidos grasos H.C. ($\Sigma=5.48\%$) | H.F. ($\Sigma=7.04\%$), benzoxazolina H.C. (69.94%) | H.F. (20.51%), polifenol H.C. (8.28%) | H.F. (5.94%), ver Tabla 21.

Tabla 21. Compuestos presentes en la fase DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco

		ÁCIDO GRASOS						
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
01	Linoleato de etilo	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	95.29	308.3	67.1	20.641	2.47%	
02	Oleato de etilo	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	89.83	310.3	28.1	20.687	1.23%	
19		C ₁₉ H ₃₄ O ₂	92.17	294.3	67.1	20.044	1.78%	
		BENZOXAZOLINOIDES						
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
22	6-metoxi-2-benzoxazolinona	C ₈ H ₇ NO ₃	96.47	165.0	165.09	17.731	69.94%	
		POLIFENOLES						
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
23	Propilparabeno	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	89.15	180.1	121.01	14.959	8.29%	
		OTROS						
24	<i>d</i> -manosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	80.34	180.1	60.1	16.066	3.41%	
25		C ₁₉ H ₃₆ O ₃	83.72	312.3	95.1	21.673	2.79%	
26	Ácido carbámico, éster fenílico	C ₇ H ₇ NO ₂	83.92	137.0	94.1	7.084	2.27%	
27	Carbamulto	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	83.89	207.1	150.1	11.642	1.52%	
28	4-hidroxi-2-metilacetofenona	C ₉ H ₁₀ O ₂	85.56	150.1	150.1	11.616	1.50%	
29	N.D.	-	-	-	28.1	19.61	1.21%	
30	N.D.	-	-	-	165	18.198	1.11%	
		ÁCIDO GRASOS						
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
01	Linoleato de etilo	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	96.82	308.3	67.1	20.641	3.80%	
03	Palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	85.31	284.3	88.1	19.071	1.97%	
02	Oleato de etilo	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	89.56	310.3	28.1	20.687	1.27%	
		BENZOXAZOLINOIDES						
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
20	6-metoxi-2-benzoxazolinona	C ₈ H ₇ NO ₃	95.17	165	165.1	17.593	20.51%	
		POLIFENOL						
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
23	Propilparabeno	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	90.36	180.1	121	14.953	4.89%	
22	Éster etílico del ácido ferúlico	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	81.68	222.1	222.1	18.592	1.05%	
		OTROS						
Cpd.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
23	Etil- α - <i>d</i> -glucopiranosido	C ₈ H ₁₆ O ₆	86.98	208.1	60.1	16.312	35.64%	
22	<i>d</i> -manosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	82.26	180.1	28.1	13.422	8.27%	
26	Ácido carbámico, éster fenílico	C ₇ H ₇ NO ₂	80.25	137	94.1	6.946	3.96%	

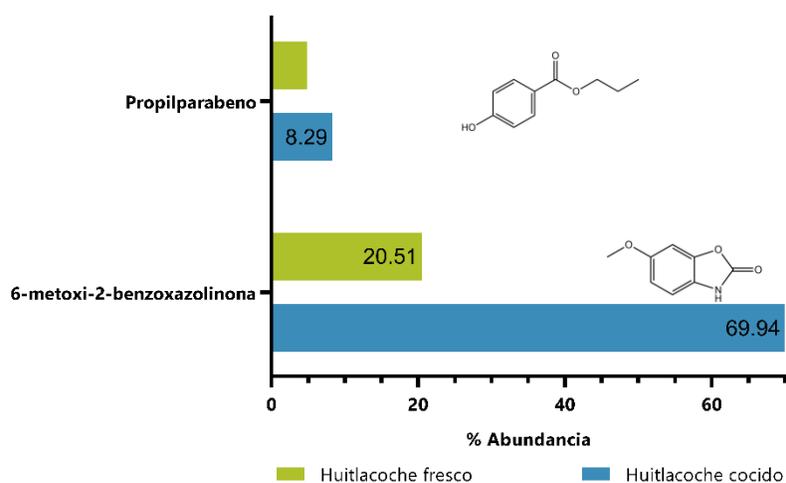
¹ Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico

²⁵ trans-11-(3-pentil-2-oxiranil)undecanoato de metilo

Dentro de los compuestos mayoritarios identificados mediante la biblioteca NIST se encuentra el 6-metoxi-2-benzoxazolinona (coixol) **22** posee una abundancia en H.C. (69.94%) | H.F. (20.51%), las investigaciones sobre su bioactividad refleja que es un buen agente antiinflamatorio, antidiabética, antiadiposito (Cui et al., 2023; Patle et al., 2023; Yu et al., 2023),y se ha reportado su influencia en la microbiota cecal (Dai et al., 2022).

Asimismo, el equipo de investigación de (Wu et al., 2023) bajo las condiciones de fermentación ha dado reporte sobre la presencia de este metabolito en el *U. maydis*. El cual se logró aislar de las fases de DCM de ambos extractos de huitlacoche, su caracterización se discute a detalle en la sección 7.4.1.

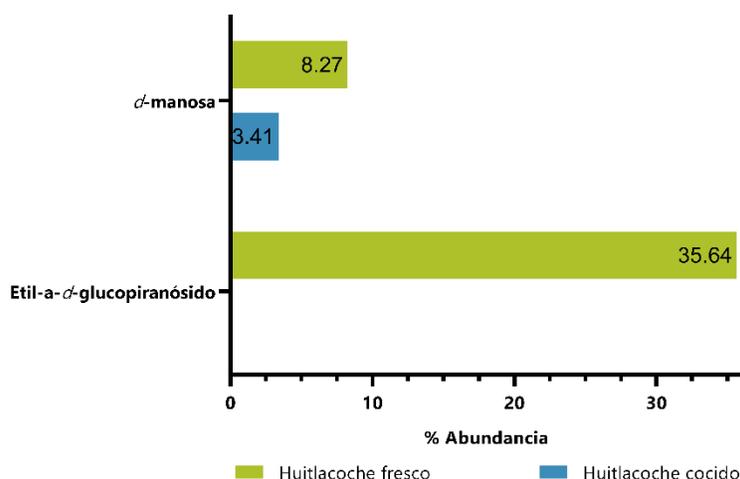
Por otro lado, tenemos al éster propílico del ácido 4-hidroxibenzoico y, como tal, pertenece a la clase de los parabenos, este propilparabeno **21** tiene una abundancia en el H.C. del 9.91% siendo el segundo dentro de los de mayor presencia y en el caso del H.F. tan sólo está presente en un 4.46%. Y ha sido reportado en su forma no esterificada (ácido 4-hidroxibenzoico) por (Rosalba Beas et al., 2011).



Gráfica 5. Metabolitos más abundantes en la fase de DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.

Ahora bien, la concentración de estos metabolitos secundarios presentes en ambos tratamientos varía, al ver la gráfica 5, el coixol tiene mayor abundancia en el huitlacoche cocido debido a la manera en que se procedió a apartar los cristales de la fase acuosa, la misma situación puede ser atribuida para el propilparabeno.

Otro tipo de metabolitos presentes son los hidratos de carbono, en la fase de DCM del H.F. se identificó al etil- α -*d*-glucopiranosido **24** con un tiempo de retención de 16.47 min y una abundancia del 42.79%; en los dos tipos de fase, el tercero más abundante también es un carbohidrato, la *d*-manosa con 3.41%, en el H.C. y para el H.F. es del 7.58%.



Gráfica 6. Carbohidratos más abundantes en la fase de DCM de huitlacoche cocido y huitlacoche fresco.

Analizando la gráfica 6, vemos que estos azúcares tienen una mayor abundancia en el huitlacoche fresco. Dicha diferencia también es atribuida a la degradación de los hidratos de carbono al ser sometidos a calor, proceso por el cual pasa el huitlacoche previo a su consumo.

Por otro lado, esta clase de biomoléculas ha sido reportada por (Lizárraga-Guerra & G. Lopez, 1998; Rosalba Beas et al., 2011; Valdez-Morales et al., 2010).

7.3.2.2 Identificación de Compuestos Polifenólicos en la Fase de DCM

El extracto etanólico de huitlacoche cocido (E.E.H.C.) y huitlacoche fresco (E.E.H.F.) se estudiaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia, los resultados con una lectura de 270 nm en el detector UV-Vis se presentan en la Figura 14.

Los resultados obtenidos del análisis de la muestra de fase de DCM del huitlacoche cocido a una $\lambda=270$ nm se detectaron 14 picos, que acorde a la información que de la Tabla 22, el pico con un $t_R=29.817$ min el de mayor porcentaje de área con 62.75 %. En el caso del H.F. se detectaron 16 picos a $\lambda=270$ nm, donde el pico con un $t_R=29.790$ min posee un porcentaje de área del 75.1548%.

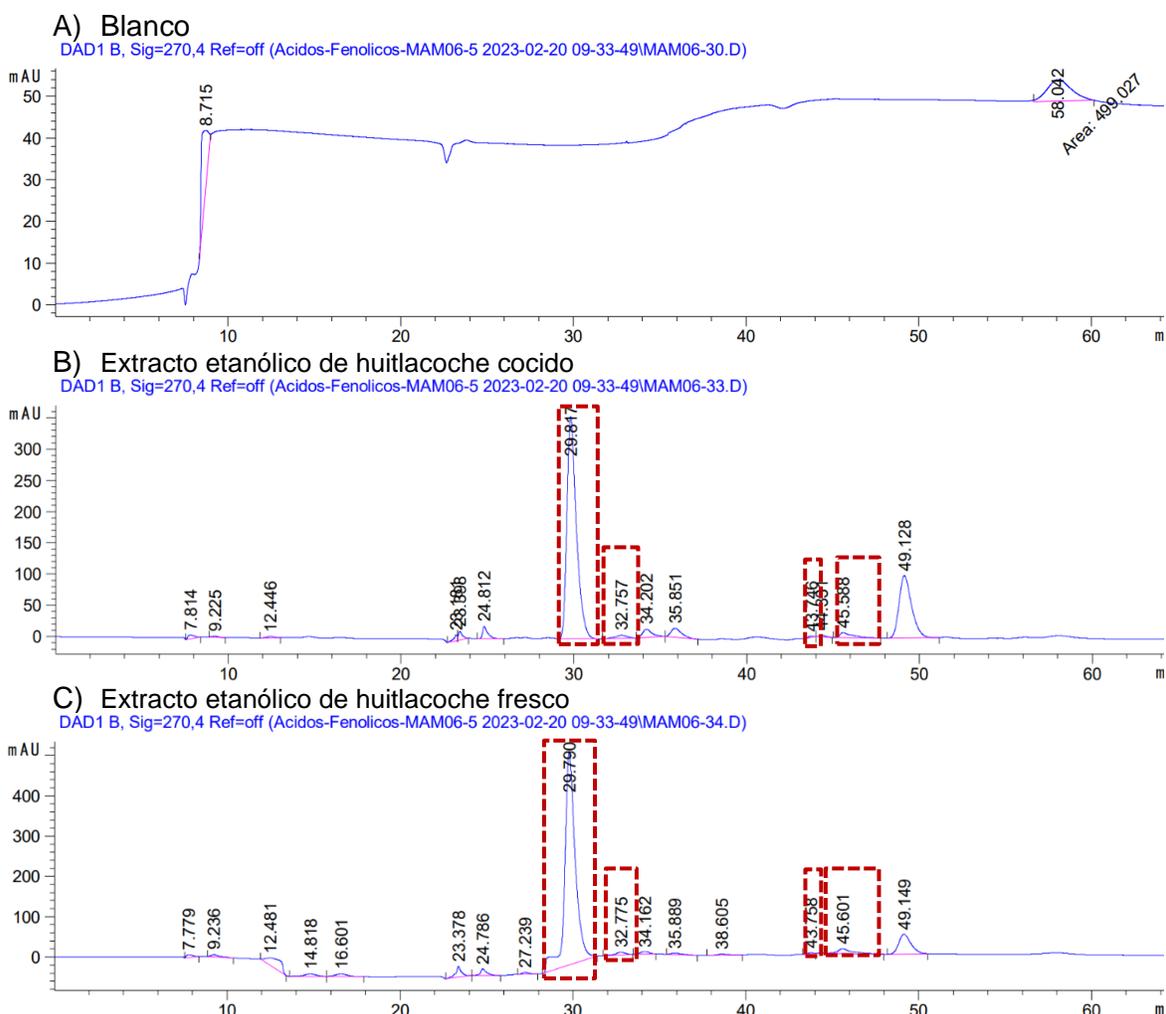


Figura 14. Cromatogramas a $\lambda=270$ nm de la fase de DCM del extracto etanólico de a) huitlacoche cocido y b) Huitlacoche fresco

Tabla 22. Tiempos de retención de los picos detectados a $\lambda=270$ nm para la fase DCM del Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (E.E.H.F.) y Huitlacoche Cocido (E.E.H.C.)

E.E.H.F.			E.E.H.C.		
T_r [min]	λ_{max} [nm]	Área %	T_r [min]	λ_{max} [nm]	Área %
7.779	-	0.5894	7.814	-	0.7920
9.236	-	0.6280	9.225	260	0.2293
12.481	-	4.6347	12.446	250	0.2865
14.818	257	0.9130	23.181	270	0.6450
16.601	260	0.9839	23.398	-	1.0582
23.378	-	2.1801	24.812	260	1.8448
24.786	260	1.3709	29.817	255	62.7494
27.239	210	0.4717	32.757	220	1.0944
29.790	255	75.1548	34.202	262	2.4030
32.775	220	0.9457	35.851	265	2.9560
34.162	300	0.7662	43.746	-	0.1979
35.889	-	0.5605	44.331	240	0.3447
38.605	253	0.3963	45.588	-	2.0069
43.758	-	0.1478	49.128	-	23.3921
45.601	-	2.3090			
49.149	-	7.9482			

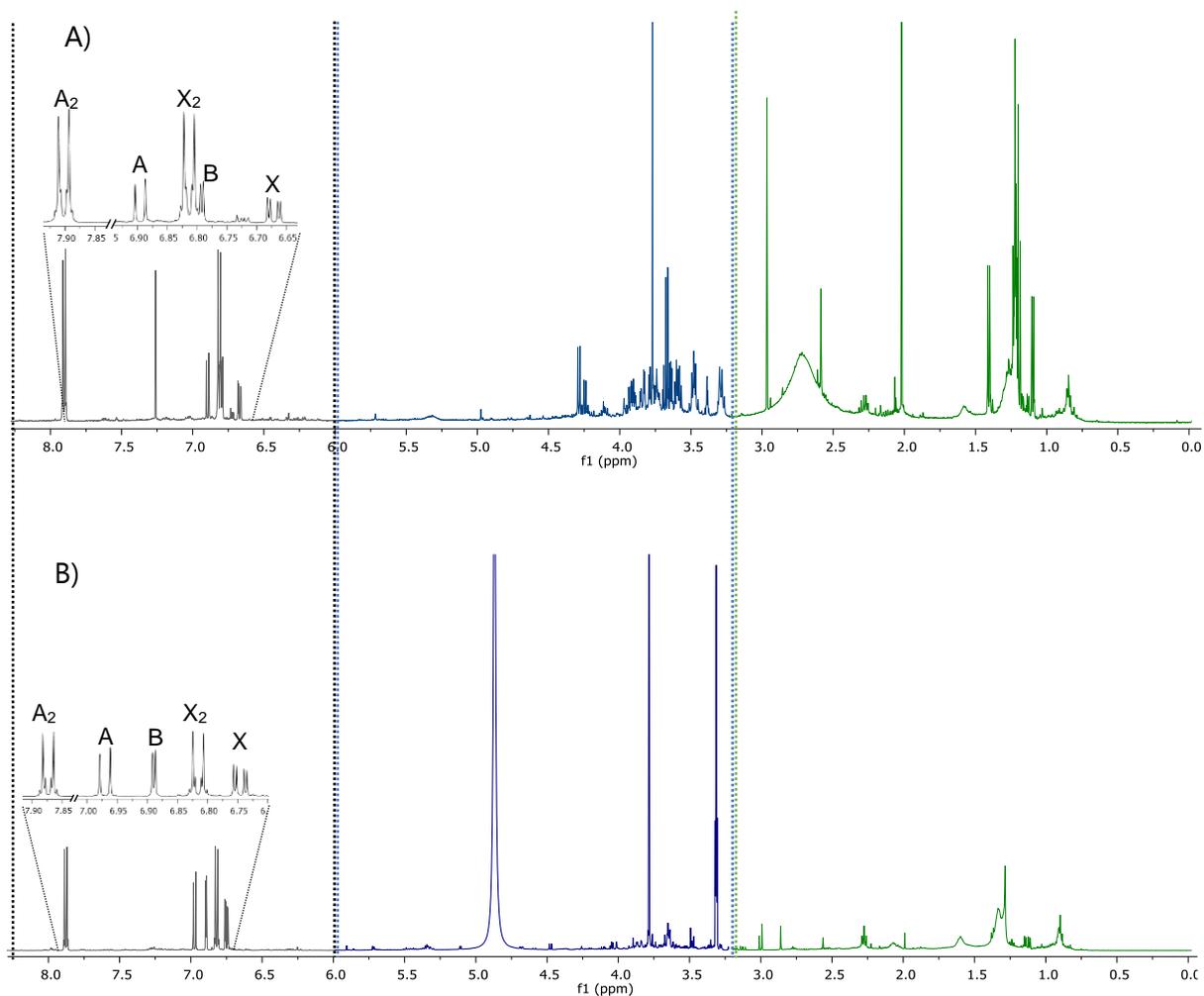
Acorde a la comparación de los tiempos de retención y sus espectros de UV de los estándares, el ácido 4-hidroxibenzoico ($t_R= 34.505$ min), ácido vainillico ($t_R= 34.505$ min), ácido *p*-cumárico ($t_R= 34.505$ min) y ácido ferúlico ($t_R= 34.505$ min) coincide con los picos en 29.817 min, 32.757 min, 43.746 min y 45.5 88 min respectivamente en el E.E.H.F, (Figura 14).

Tabla 23. Resultados de los compuestos detectados a $\lambda=270$ nm y $\lambda=300$ nm para la fase DCM del E.E.H.F. y E.E.H.C. acorde a los estándares de referencia

	E.E.H.F.				E.E.H.C.			
	$\lambda=270$		$\lambda=300$		$\lambda=270$		$\lambda=300$	
	T_r [min]	Área %	T_r [min]	Área %	T_r [min]	Área %	T_r [min]	Área %
Ácido 4-hbz	29.790	75.1548	-	-	29.817	62.7494	-	-
Ácido vainillico	32.775	0.9457	32.774	1.7853	32.757	1.0944	32.758	1.1666
Ácido <i>p</i> -cumárico	43.758	0.1478	43.764	1.6838	43.746	0.1979	42.918	0.6381
Ácido ferúlico	45.601	2.3090	45.604	21.6934	45.588	2.0069	43.741	1.4050

7.3.2.3 Perfil Químico de la Fase de DCM Basado en RMN.

Las fases de DCM de los extractos etanólicos del huitlacoche cocido y huitlacoche fresco se han analizado por RMN mostrando señales para ambos casos, **espectro 1**, en campo alto correspondiente a alifáticos, en la región de 3.5 ppm a 6 ppm observamos señales de protón base de oxígeno que se atribuye a carbohidratos y por último en la región de campo bajo hay señales aromáticas encontrando la presencia de un sistema A_2X_2 y ABX atribuido a compuestos aromáticos.



Espectro 1. Espectro ^1H -RMN, 500 MHz, CD_3OD -MeOD; fase DCM huitlacoche a) fresco, b) cocido.

7.3.2.4 Purificación de las Fases de DCM Mediante Cromatografía en Columna.

El purificación de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche cocido por cromatografía en columna derivó en 10 reuniones, (diagrama 3). El análisis por CCF se presentan en la Figura 15, en donde se observa que la gran mayoría de estas reuniones tienen manchas definidas, mencionando el caso de la reunión $\Lambda 02$ observamos 9 manchas al exponer la placa a una $\lambda=254$, la primera mancha es definida y tiene un R_f de 0.71, enseguida hay una mancha parcialmente definida la cual tiene un R_f de 0.65, la siguiente mancha definida tiene un R_f de 0.477 que de igual forma se logra apreciar en las reuniones $\Lambda 01$ y $\Lambda 03$. Al aplicar ácido sérico para el revelado, estas manchas se tiñen de negro con un contorno amarillo, situación similar al compuesto aislado posteriormente.

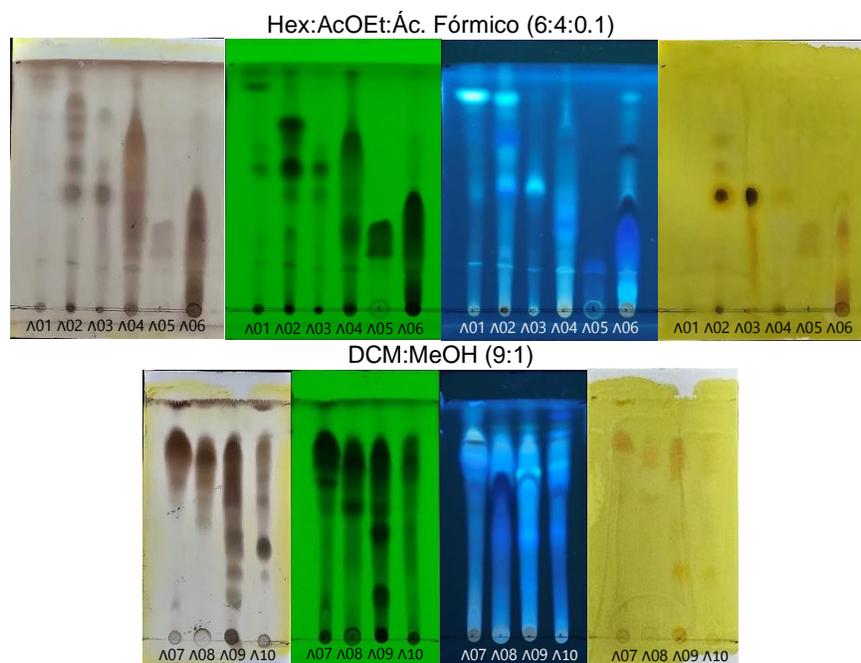


Figura 15. Placas de CCF de las reuniones del fraccionamiento de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche cocido vistas en onda corta y larga

La reunión $\Lambda 03$ que corresponde a las fracciones 31-38, presentaron un sólido blanquecino el cual se apartó como se muestra en la Figura 16A y del cual se obtuvo un rendimiento del 1.4% (7 mg), se analizó por CG-EM y RMN, ver sección 7.4.1. Este compuesto se comparó en CCF (Figura 16C) con la fase de DCM de Huitlacoche Cocido (H.C.) junto con 3 de los 4 polifenoles (Ác. 4-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido vainílico) identificados en HPLC, y por último con el compuesto obtenido en la reunión Λ -R03.

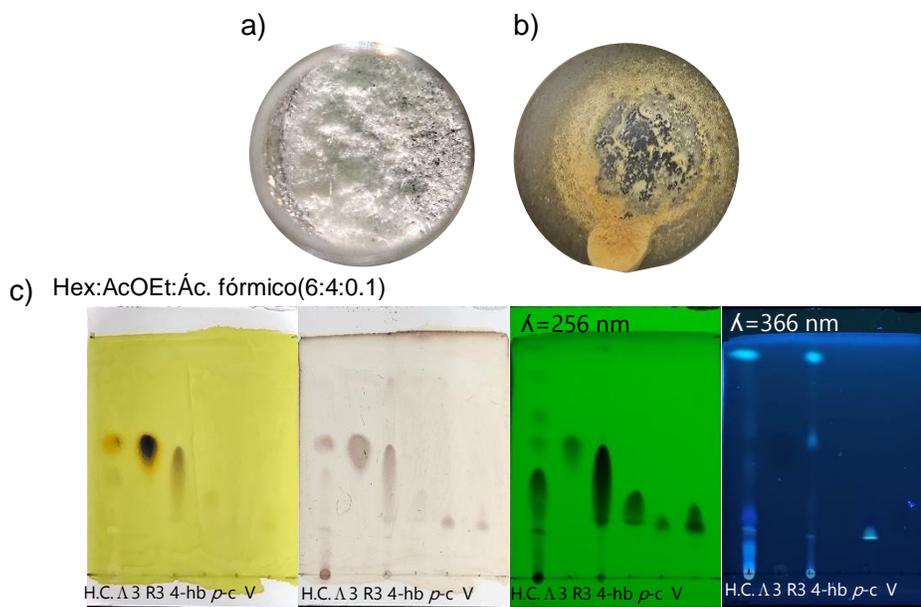


Figura 16. a) Sólido blanco de la reunión $\Lambda 03$, b) Sólido pastoso de la reunión Λ -R03 c) placa CCF comparativa de la fase de DCM del huitlacoche cocido (H.C.), reunión ($\Lambda 03$), reunión (Λ -R03), ác 4-hidroxibenzoico (4-hb), ác. p-cumárico (p-c), Ácido vainillico (V)

La reunión $\Lambda 05$ (51.4 mg) se fraccionó generando 280 fracciones, las cuales se agruparon en 8 reuniones acorde a su homogeneidad en CCF, ver Figura 17. En reunión Λ -R03 se obtuvo una pasta con coloración anaranjado-marrón, (Figura 16B), dicha muestra se analizó por CG-EM y RMN los resultados se muestran en la sección 7.4.2.

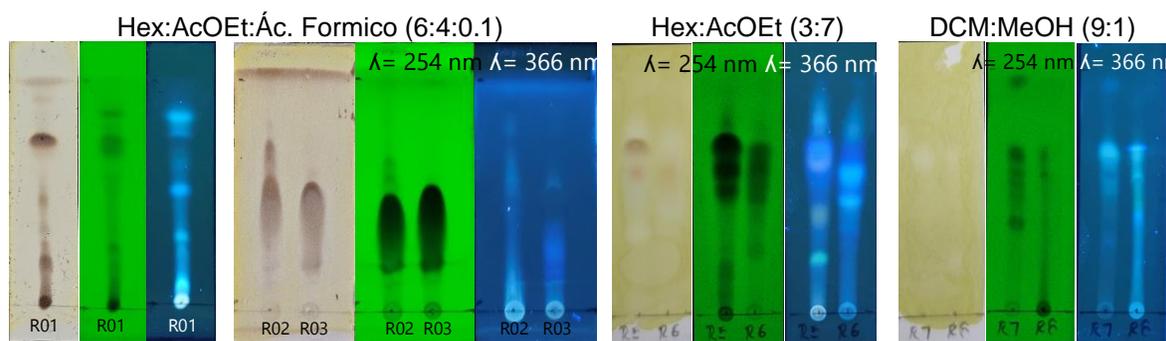


Figura 17. Placa CCF reuniones fraccionamiento $\Lambda 05$.

En la placa de CCF vemos que la reunión Λ -R05 tiene tres manchas definidas vistas en $\lambda=254$ nm cuyos Rf son 0.69, 0.60, 0.51 respectivamente. Esta muestra se analizó por CG-EM; los resultados se pueden consultar en la anexos 10.6.

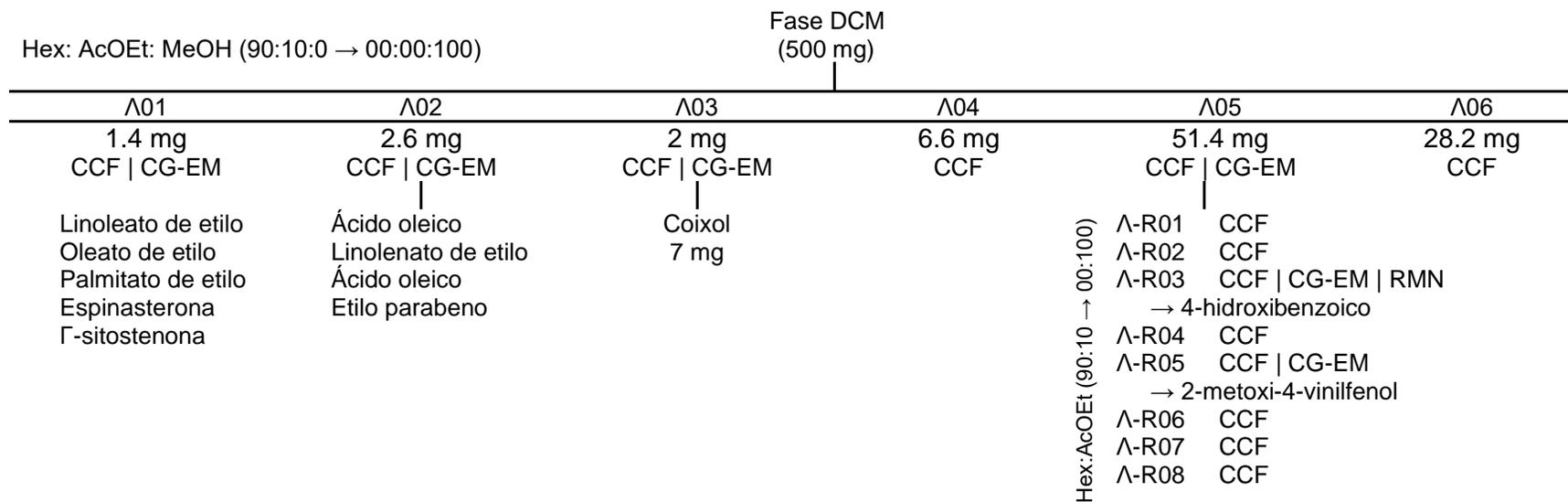


Diagrama 3. Reuniones del fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la fase de DCM extracto etanólico de huitlacoche cocido

El fraccionamiento de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche fresco, diagrama 4, se obtuvieron 12 reuniones, las cuales se analizaron por cromatografía en capa fina (Figura 18)

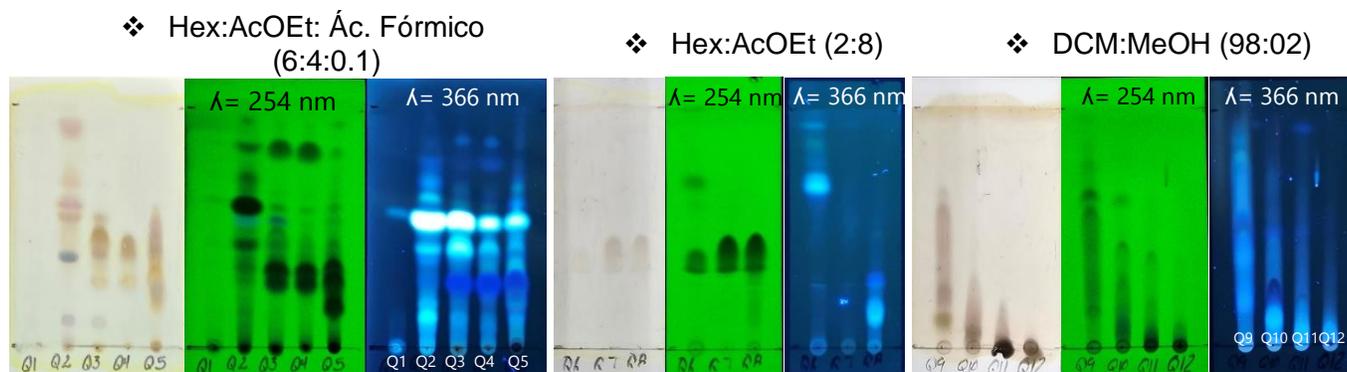


Figura 18. Placas de CCF de las reuniones del fraccionamiento de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche fresco vistas en onda corta y larga.

La reunión Q05 que corresponde a las fracciones 201-240, presentaron un precipitado blanquecino (6-Metoxi-2-Benzoxazolinona) al igual que reunión Λ 03 y del cual se obtuvo 27 mg con un rendimiento del 3.3% respecto a la fase de DCM.

En la reunión Q6 se obtuvo una pasta de consistencia sólida de color anaranjado pardo muy similar a lo visto en la reunión Λ -R03 de la fase de DCM del huitlacoche cocido, dicho compuesto aislado corresponde al ácido 4- hidroxibenzoico. Este tuvo un rendimiento del 1.43% (4.3 mg) respecto a la fase de DCM utilizado en este fraccionamiento.

En la Figura 19, se muestra la comparación de la reunión Q05- Λ 03 por cromatografía en capa fina, observando que Q05 se encuentra parcialmente pura en contraste a Λ 03.

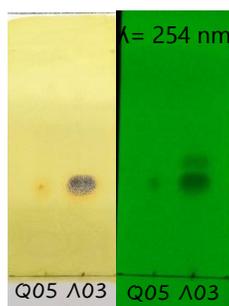


Figura 19. Placa comparativa de CCF del compuesto obtenido en el fraccionamiento de las fases de DCM de ambos extractos.

Fase DCM
(3 g)

Q01	Q02	Q03	Q04	Q05	Q06	Q07	Q08	Q09
107.4 mg	9.3 mg	4.7 mg	6.1 mg	7.9 mg	93.4 mg	152.9 mg	172.6 mg	57 mg
CCF CG-EM	CCF CG-EM	CCF CG-EM	CCF CG-EM	CCF CG-EM	CCF CG-EM	CCF CG-EM	CCF CG-EM	CCF CG-EM
<i>Linoleato de etilo</i> <i>Palmitato de etilo</i> <i>Linoleato de metilo</i> <i>Palmitato de metilo</i>	Q-V01 CCF CG-EM Linoleato de etilo Palmitato de etilo Oleato de etilo linoleato de metilo Palmitato de metilo Γ-sitosterona Espinasterona 4-campestene-3-uno Q-V02 CCF Q-V03 CCF Q-V04 CCF Q-V05 CCF Q-V06 CCF Q-V07 CCF Q-V08 CCF	Espinasterona Linoleato de etilo Γ-Sitosterona 4-campestene-3-ur Palmitato de metilo Oleato de etilo Linoleato de metilo	Ferulato de etilo	Coixol 17 mg	Ácido 4-hb 4.5 mg	Ácido 4-hb	β-Metil xilósido 4-vinilguaiacol Ciclo (leucil prolilo) Fenol	Q-S01 CCF Q-S02 CCF Q-S03 CCF Q-S04 CCF CG-EM Octocrileño heptacosano Q-S05 CCF Q-S06 CCF Q-S07 CCF

Diagrama 4. Reuniones del fraccionamiento primario del extracto etanólico de huitlacoche cocido

La reunión Q2 (0.790 g) se fraccionó obteniéndose 420 fracciones dando un seguimiento por CCF agrupándolas en 9 reuniones, (Figura 20). Y la subreunión Q-V01 se analizó por CG-EM, los resultados se muestran en anexos 10.7.

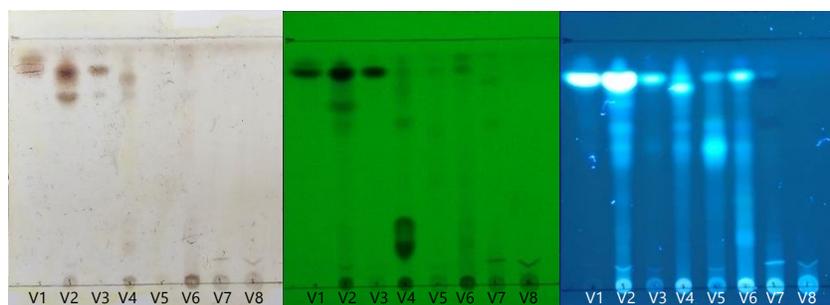


Figura 20. Placa CCF reuniones fraccionamiento Q02 en un sistema hexano: AcOEt: Ác. Fórmico (6:4:0.1)

En el caso del paso de la reunión Q9 (0.790 g) por la columna de cromatografía se obtuvieron 230 fracciones estas acorde a su similitud metabólica apreciada por CCF se agruparon en 7 reuniones, ver Figura 21. La subreunión Q-S04 se llevó a un estudio por CG-EM cuyos resultados se enseñan en anexos 10.8.

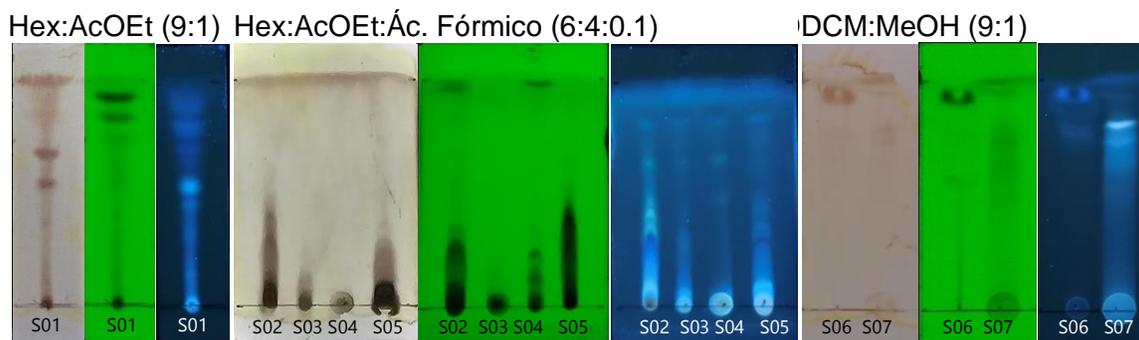


Figura 21. Placa CCF reuniones fraccionamiento Q09 en un sistema hexano: AcOEt: Ác. Fórmico (6:4:0.1).

7.3.2.4.1 Identificación de Compuestos por CG-EM de la Reunión $\Lambda 05$ y Q09 .

Para el análisis en cromatografía de gases de la reunión $\Lambda 05$ derivada del fraccionamiento de la fase de DCM de H.C., se detectó 65 picos en su cromatograma, (Figura 22A), que se encuentran entre el minuto 6 y 36, donde 23 de ellos tienen un score mayor a 80 en la biblioteca NIST.

Por otro lado, el análisis de la reunión Q09 del fraccionamiento de la fase de DCM de H.F. por cromatografía de gases el software detectó 41 picos en su cromatograma, (Figura 22B), que se encuentran entre el minuto 6 y 29, donde 17.07% de ellos tiene una coincidencia mayor al 80% con la biblioteca NIST.

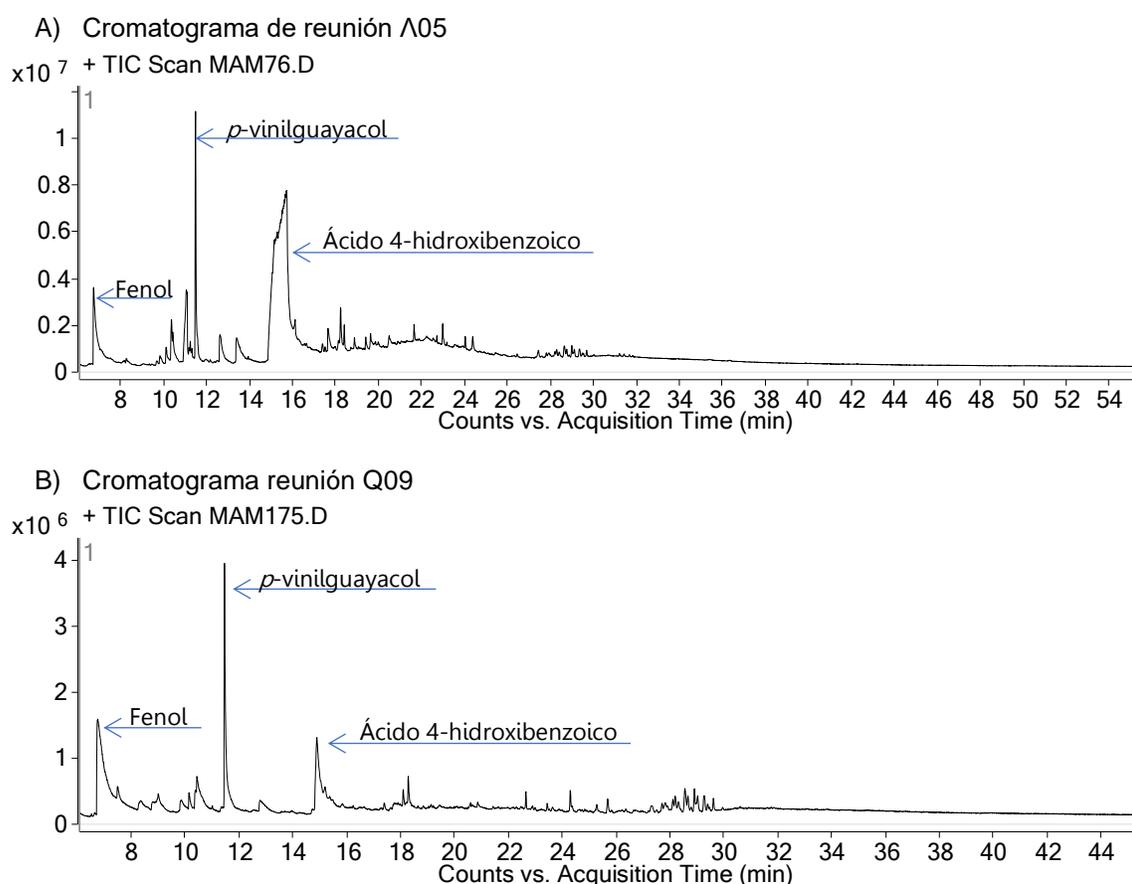


Figura 22. Cromatograma de la reunión $\Lambda 05$ y reunión Q09

En la Tabla 24, se enlistan aquellos metabolitos presentes en estas reuniones acorde al procesamiento de datos en la biblioteca NIST, se sugiere la presencia de compuestos como fenoles $\Lambda 05$ (12.88%) | Q09 (29.58%), ácidos *p*-hidroxicinámicos $\Lambda 05$ (25.61%) | Q09 (17.15%), ácidos benzoicos $\Lambda 05$ (6.26%) | Q09 (14.05 %).

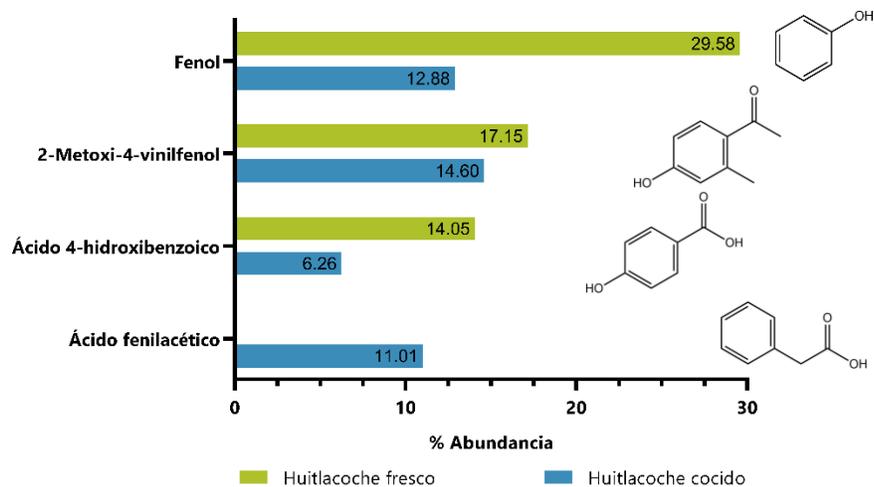
Tabla 24. Compuestos presentes en la reunión $\Lambda 05$ y reunión Q09

		FENOLES						
	Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
reunión $\Lambda 05$	51	Fenol	C ₆ H ₆ O	96.78	94	94.1	6.742	12.88%
	ÁCIDOS <i>p</i> -HIDROXICINÁMICOS							
	Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
	54	2-Metoxi-4-vinilfenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	95.01	150.1	150.1	11.485	14.60%
	55	Ácido fenilacético	C ₈ H ₈ O ₂	93.47	136.1	91.1	11.051	11.01%
		ÁCIDO BENZOICO						
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
56	Ácido 4-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	93.33	138	121.1	15.15	6.26%	
		FENOLES						
reunión Q09	Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
	51	Fenol	C ₆ H ₆ O	96.42	94	94.1	6.768	29.58%
	ÁCIDOS <i>p</i> -HIDROXICINÁMICOS							
	Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
	54	2-metoxi-4-vinilfenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	94.47	150.1	150.1	11.471	17.15%
		ÁCIDO BENZOICO						
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área	
56	Ácido 4-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	90.99	138	121.1	14.9	14.05%	

La reunión Q09 de la fase de DCM del HF y la $\Lambda 05$ del HC guardan una similitud de metabolitos secundarios, iniciando por el 2-Metoxi-4-vinilfenol **54** (*p*-vinilguayacol) es el mayoritario con $\Lambda 05$. (14.6%) | Q09 (17.15%), este ácido cinámico deriva de la descarboxilación del ácido ferúlico; cuya bioactividad comprende antioxidante (Rubab et al., 2020), antiinflamatorio (Asami et al., 2023; Jeong et al., 2011), anticancerígeno (Luo et al., 2021), ver grafica 7

El compuesto **51** predomina en la reunión Q09 (20.58%) en contraste a la $\Lambda 05$ con (12.88%), seguido del ácido bencenoacético **55** $\Lambda 05$. (11.01%).

Se identificó la presencia del ácido 4-hidroxibenzoico **56** con una abundancia del 6.26%, que corrobora los datos del análisis en HPLC-DAD para la presente fase.



Gráfica 7. Metabolitos mayoritarios para la reunión $\Lambda 05$ del huitlacoche cocido y Q09 del huitlacoche fresco

7.3.3 Identificación de compuestos en las fases Hidroalcohólicas

7.3.3.1 Análisis por CLAE de Polifenoles en las Fases Hidroalcohólicas.

Las fases hidroalcohólicas de los extractos etanólicos de huitlacoche cocido y fresco se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución, los cromatogramas obtenidos a una $\lambda = 270$ nm se muestran en la Figura 23.

Con base a los tiempos de retención y porcentaje de área de los picos mostrados en la Tabla 25 y analizando el cromatograma de la Figura 23C, para el H.F. se aprecia que a $\lambda = 270$ nm se detectaron siete picos donde aquel con un $t_R = 23.384$ min tiene un porcentaje de área del 16.95%.

Por el contrario, en el cromatograma del H.C., (Figura B), encontramos nueve picos, aquel con un $t_R = 23.224$ min tiene el mayor porcentaje de área con 19.6862 %.

Tabla 25. Tiempos de retención de los picos detectados a $\lambda = 270$ nm para la fase hidroalcohólica del Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (E.E.H.F.) y Huitlacoche Cocido (E.E.H.C.)

E.E.H.F.			E.E.H.C.		
T_r [min]	λ_{max} [nm]	Área %	T_r [min]	λ_{max} [nm]	Área %
7.392	-	3.8870	7.387	-	1.7772
7.731	-	6.2227	7.764	-	5.0344
12.585	220	6.7674	12.619	260	6.5158
23.194	255	15.9188	23.224	245	19.6862
23.384	280	16.9537	24.850	260	15.0455
24.827	260	6.7520	29.931	250	12.0307
29.897	260	14.4088	34.358	-	9.4241
			36.080	260	8.6269
			38.816	250	2.8153

Con base a la comparación de los tiempos de retención y sus espectros de UV de los estándares, el ácido 4-hidroxibenzoico ($t_R = 30.064$ min) coincide con el pico en 29.931 min del E.E.H.C. y 29.897 min del E.E.H.F.

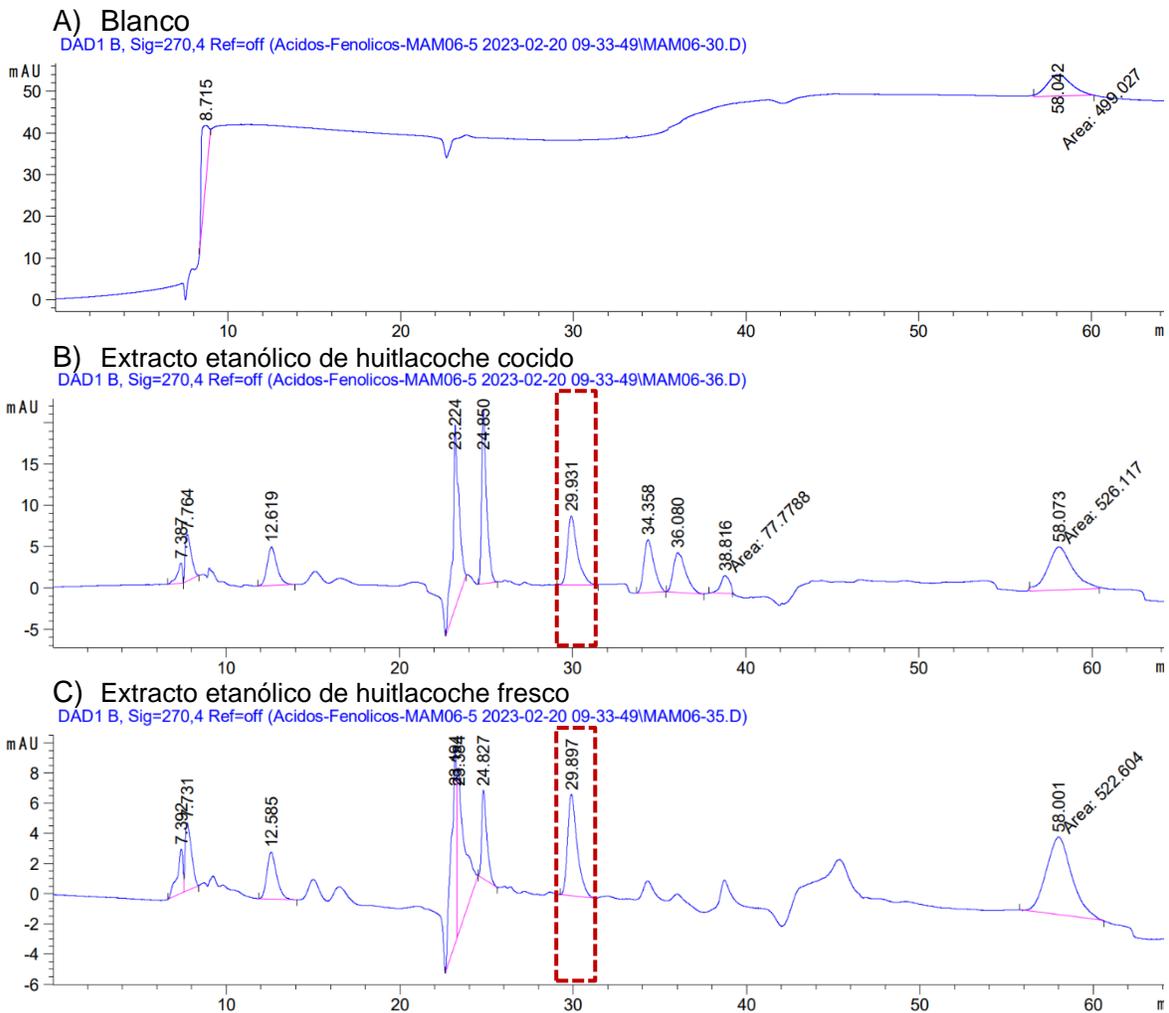
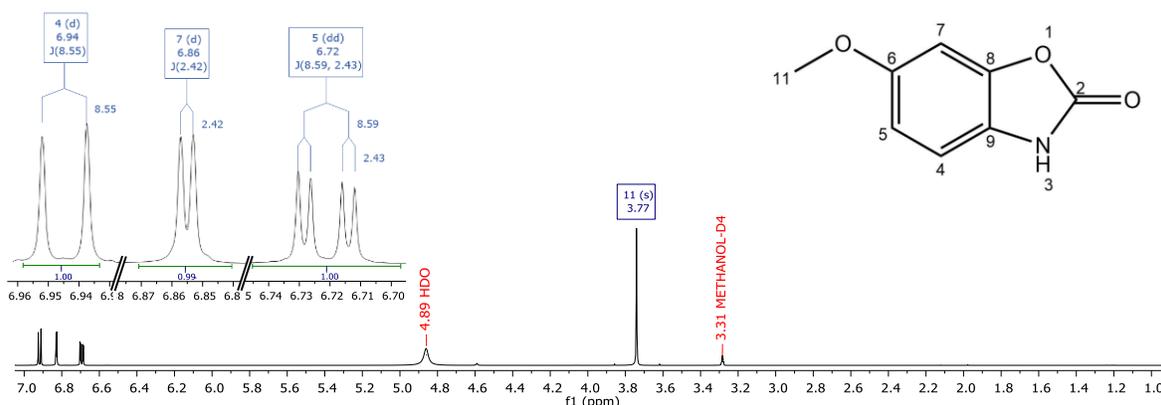


Figura 23. Cromatogramas a $\lambda = 270$ nm de la fase hidroalcohólica del extracto etanólico de a) huitlacoche fresco y b) Huitlacoche Cocido.

7.4 Caracterización de Compuestos Aislados

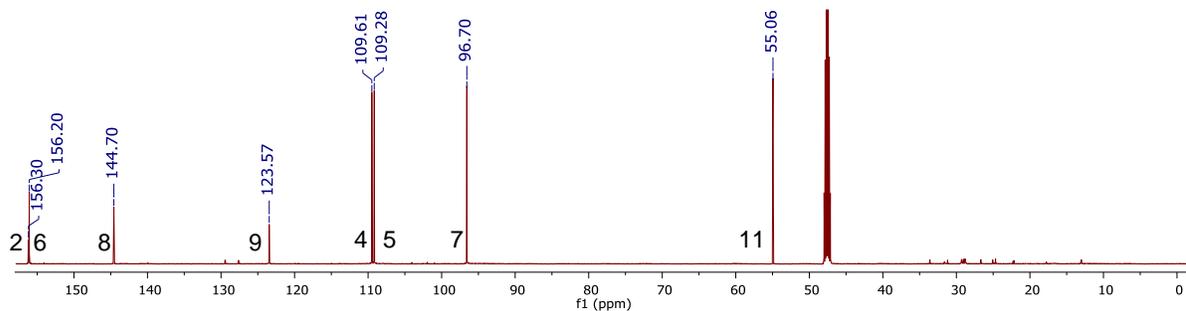
7.4.1 Caracterización de 6-Metoxi-2-Benzoxazolinona (Coixol)

El cristal blanco obtenido a partir de la purificación de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche cocido y extracto etanólico de huitlacoche fresco, se analizó por RMN (600 MHz) de 1D Y 2D. El espectro de ^1H evidencia a campo bajo una señal doble en $\delta_{\text{H}4}$ 6.94 ($J = 8.6$ Hz, 1H) con una constante tipo *orto* que acopla al H_5 , una señal doble en $\delta_{\text{H}7}$ 6.85 ($J = 2.4$ Hz, 1H) con una constante de tipo *meta* que acopla al H_4 y una señal doble de doble en $\delta_{\text{H}5}$ 6.72 ($J = 8.6, 2.5$ Hz, 1H) con una constante de tipo *orto* y *meta* que acopla al H_7 y H_4 , que conforman el sistema de espines ABX del anillo aromático. Además en la región media del espectro se observa una señal singulete en $\delta_{\text{H}11}$ 3.77 (3H) perteneciente a un metoxilo, espectro 2.



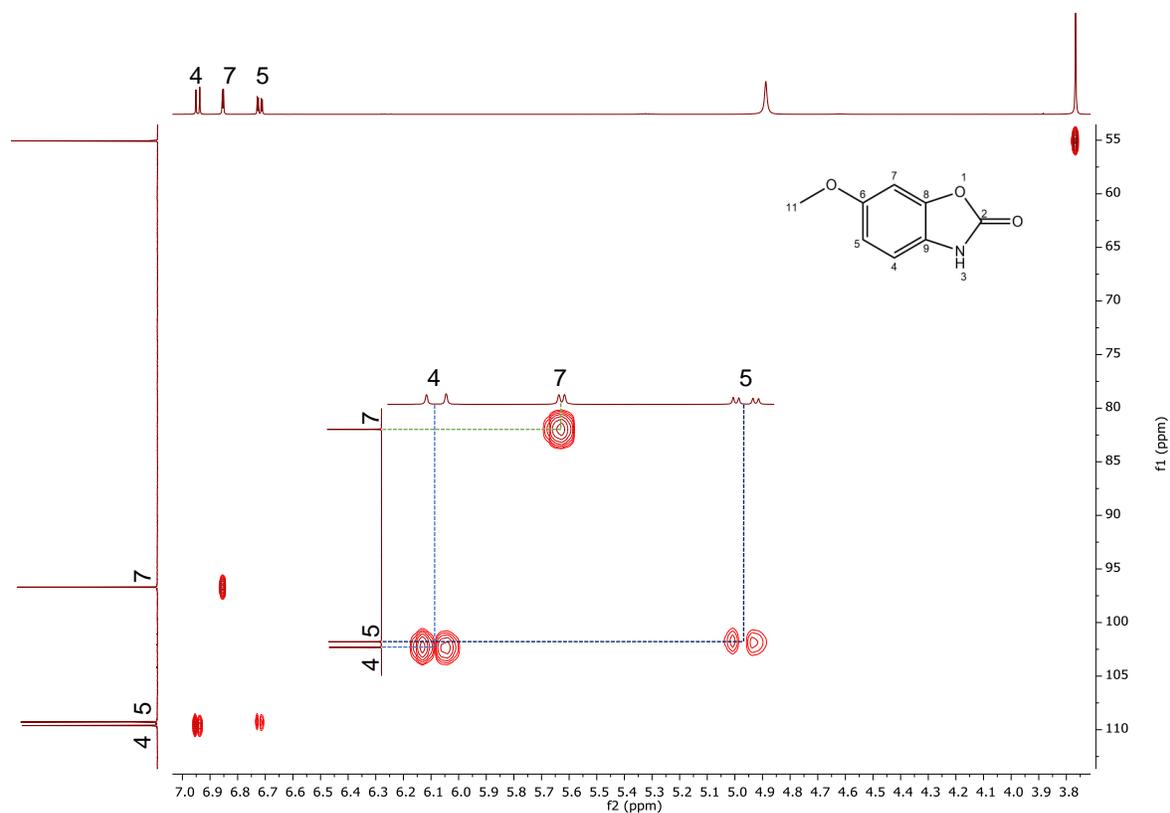
Espectro 2. ^1H RMN (600 MHz, Metanol- d_4) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.

En el espectro de RMN de ^{13}C , **espectro 3**, se observan 8 señales, de las cuales cuatro pertenecen a carbonos cuaternarios (δ 156.30, 156.20, 144.70, 123.57), tres metinos aromáticos (δ 109.61, 109.28, 96.70) y se observa una señal de metileno en δ 55.06 ppm.



Espectro 3. ^{13}C RMN (150 MHz, Metanol- d_4) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.

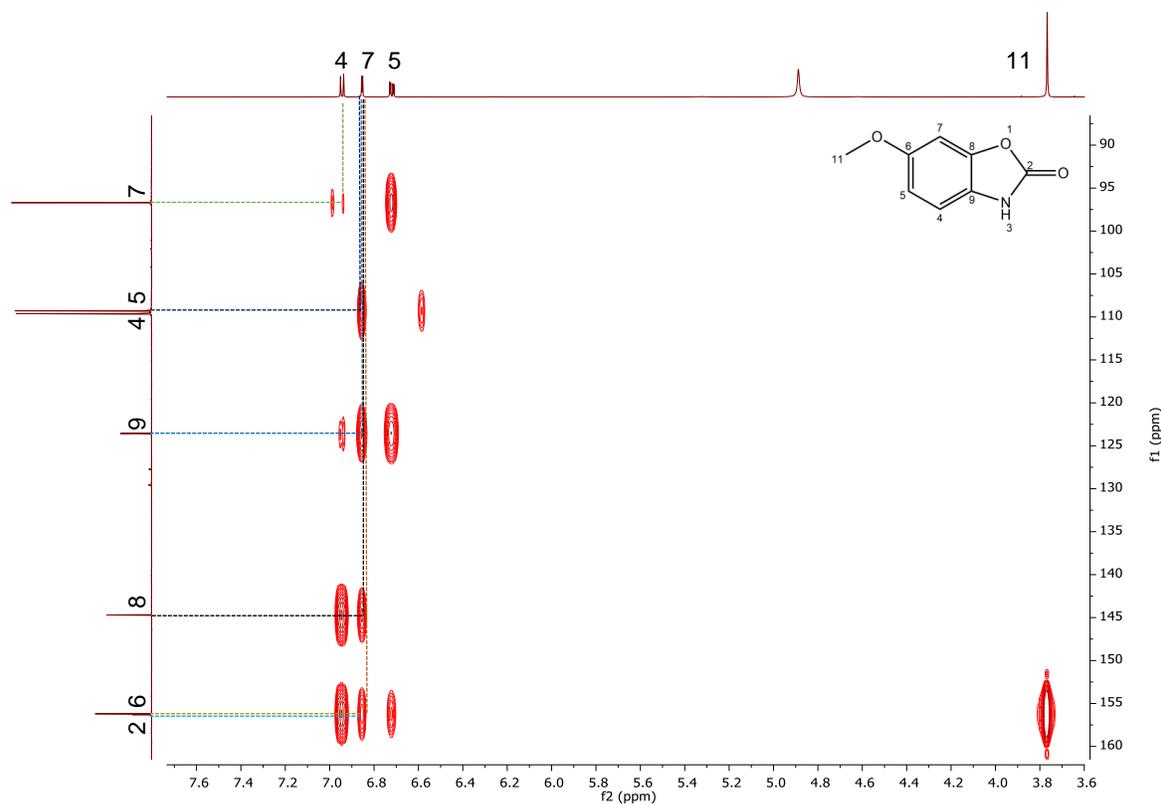
El experimento HSQC, permitió asignar de manera inequívoca las correlaciones heteronucleares C-H a una ligadura, donde δ_{C11} 55.06/ δ_H 3.77; para los carbonos aromáticos δ_{C7} 96.70 / δ_H 6.85, δ_{C5} 109.28 / δ_H 6.72, δ_{C4} 109.61/ δ_H 6.95, ver **espectro 4**.



Espectro 4. HSQC RMN (600 MHz, Metanol-d4) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.

A través del experimento HMBC, espectro 5, vemos que el carbono δ_{C7} 96.70 correlaciona con el protón δ_{H5} 6.72 y δ_{H4} 6.94. El carbono δ_{C5} 109.28 correlaciona con δ_{H5} 6.72, δ_{H7} 6.85, δ_{H4} 6.94, confirmando que el posicionamiento de estos protones pertenecientes al sistema de espines ABX se encuentran en el mismo anillo aromático.

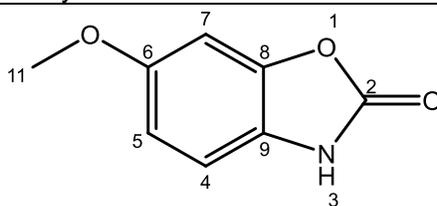
En el caso de los carbonos cuaternarios, el carbono δ_{C9} 123.57 correlaciona con el protón δ_{H5} 6.72, δ_{H7} 6.85, δ_{H4} 6.94, mencionando que este carbono es desplazado debido al efecto de desprotección que ejerce el heteroátomo adyacente; el otro carbono δ_{C8} 144.70 tiene una correlación con los protones δ_{H5} 6.72, δ_{H7} 6.85, δ_{H4} 6.94 y para el caso del carbono δ_{C6} 156.20 tiene una correlación con el protón δ_{H11} 3.77, δ_{H7} 6.85, δ_{H4} 6.94



Espectro 5. HMBC RMN (600 MHz, Metanol-d4) del 6-metoxi-2-benzoxazolinona.

Los datos obtenidos de los experimentos 1D y 2D de RMN tienen concordancia con lo reportado por (Otaka et al., 2023) elucidando así al compuesto 6-Metoxi-2-benzoxazolinona (coixol), ver Tabla 26.

Tabla 26. Resultados RMN 1D y 2D de 6-Metoxi-2-benzoxazolinona (coixol).



No. C	δ C		δ H	HMBC
2	156.30	C	-	-
4	109.61	CH	δ_{H4} 6.94 (d, 1H, J = 8.6 Hz)	C5, C6, C8, C9
5	109.28	CH	δ_{H5} 6.72 (dd, 1H, J = 8.6, 2.5 Hz)	C4, C6, C7, C9
6	156.20	C	-	-
7	96.70	CH	δ_{H7} 6.85 (d, 1H, J = 2.4 Hz)	C5, C6, C8, C9
8	144.70	C	-	-
9	123.57	C	-	-
11	55.06	CH ₃	δ 3.77(s, 3H)	C6

La identidad del compuesto, se confirmó mediante un análisis por cromatografía de gases acoplado a masas, en donde se observó un pico único con un $t_r = 17.76$ min, (Figura 24), que por comparación con la biblioteca NIST sugiere que es el compuesto 6-Metoxi-2-benzoxazolinona con un score de similitud del 96.8 %.

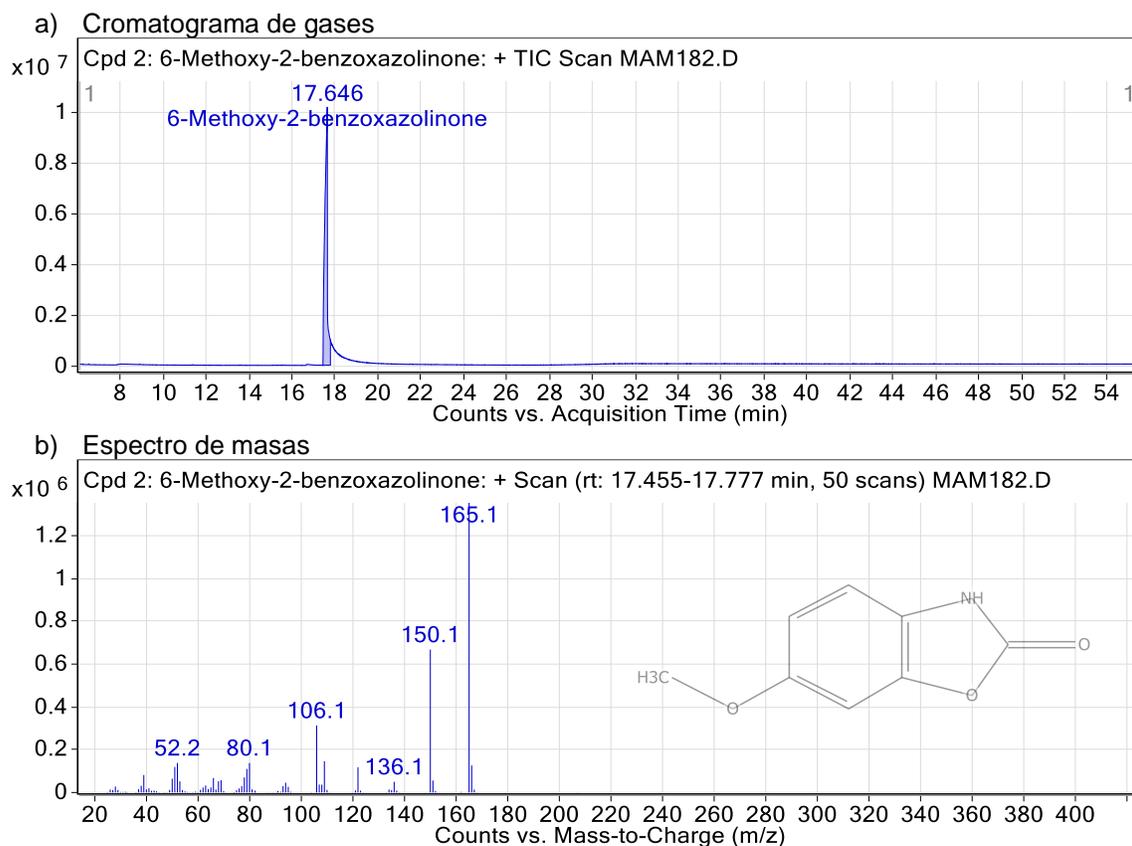
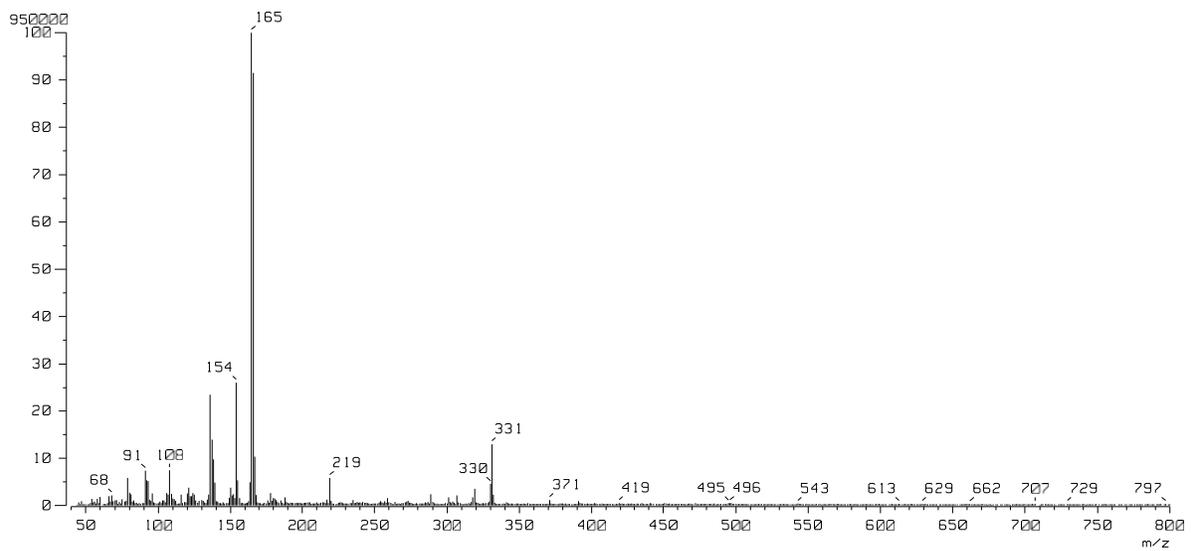


Figura 24. CG-EM del 6-Metoxi-2-benzoxazolinona

La muestra del 6-Metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) de igual forma se analizó por espectrometría de masas de alta resolución (FAB⁺), espectro 6, los resultados sugieren una fórmula molecular de C₈H₈O₃N con un m/z [M + H]⁺ de 166.0508, lo que confirma la presencia de los heteroátomos N y O pertenecientes al anillo de oxazolidona, y el pico base se encuentra a m/z 165.



Espectro 6. Espectrometría de masas de alta resolución del MBOA.

En cuanto a los reportes de actividad biológica que tiene el Coixol, ha sido evaluado en antiinflamatorio (Cui et al., 2023; Hu et al., 2020), anti-tumoral (Hu et al., 2020), antidiabética (Patle et al., 2023), antiadiposito (Yu et al., 2023), segregador de insulina (Hameed et al., 2019) y se ha reportado su influencia en la microbiota cecal (Dai et al., 2022).

7.4.2 Caracterización del Ácido 4-Hidroxibenzoico

La reunión Q04 de la fase de DCM del extracto etanólico de huitlacoche fresco se analizó por CG-EM, (Figura 25), en donde se observó un pico mayoritario con m/z de 138.03 en un TR= 15.143 min, la biblioteca NIST sugiere que corresponde a un ácido fenólico como ácido 4-hidroxibenzoico con una de 95.99 con una abundancia del 46%.

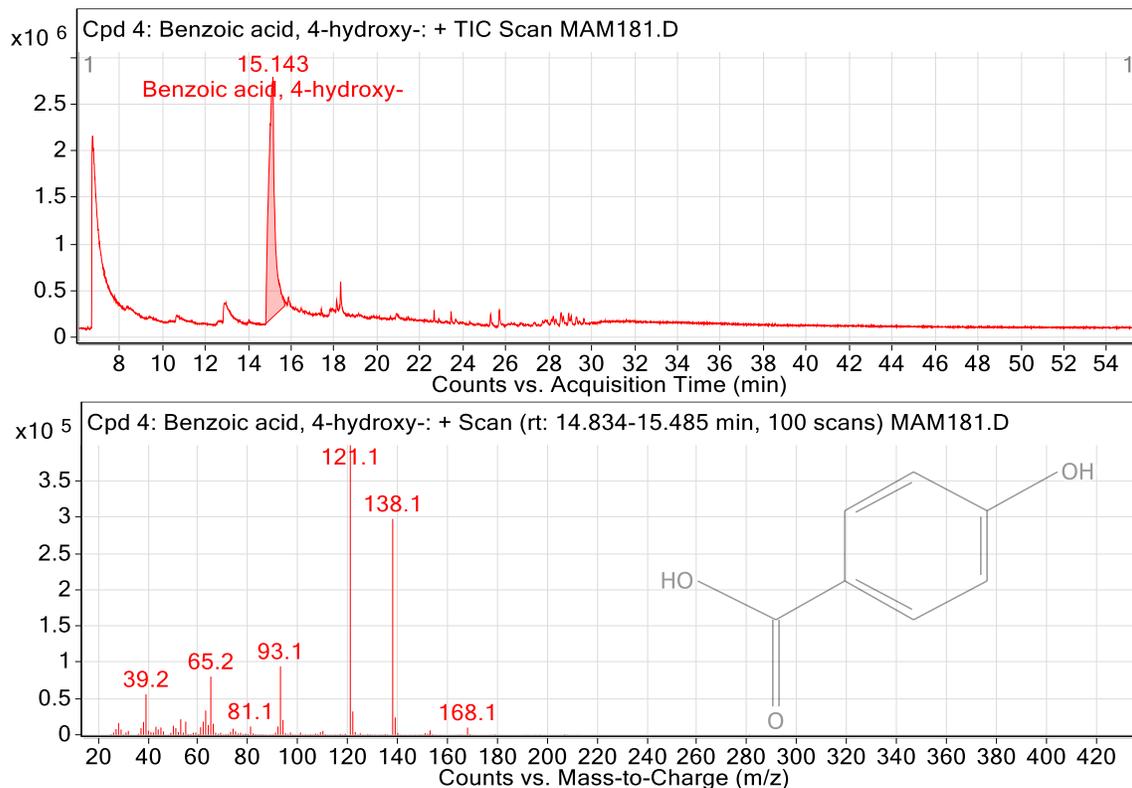
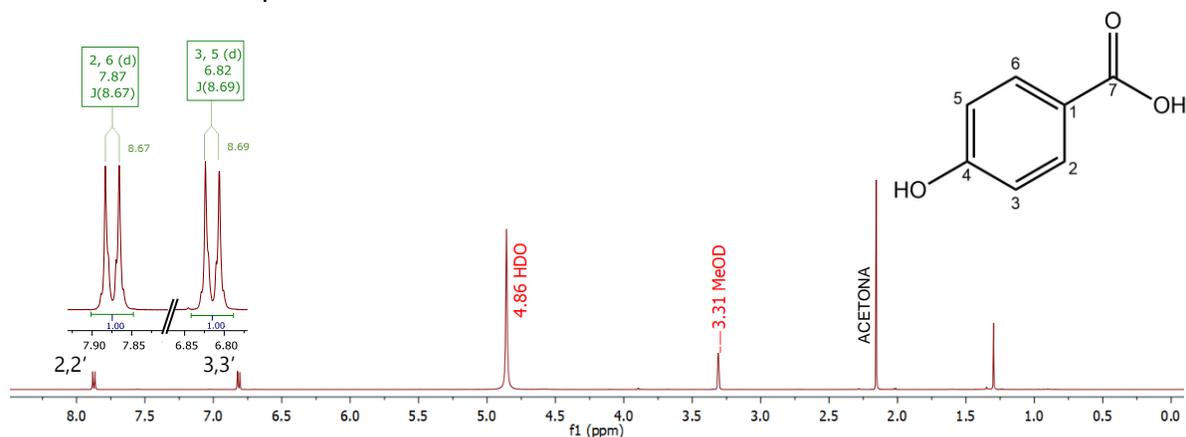


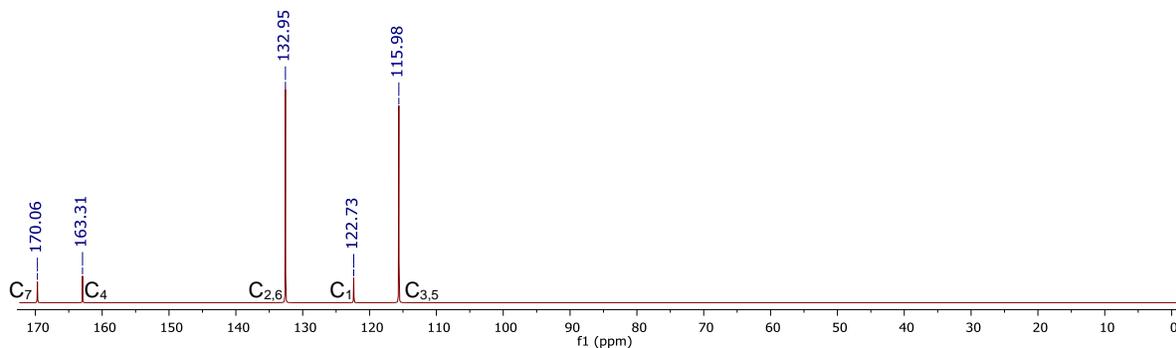
Figura 25. Cromatograma de gases de la reunión Q04 (superior) y cromatograma de masas del ácido 4-hidroxibenzoico (inferior)

Posteriormente se analizó mediante experimentos de RMN (600 MHz) de 1D Y 2D., en el espectro de ^1H a campo bajo tenemos una señal doble en δ 7.87 ($J = 8.67$ Hz, 2H), una señal doble a δ 6.82 ($J = 8.69$ Hz, 2H), que conforman el sistema de espines AA'BB' del anillo aromático, espectro 7.



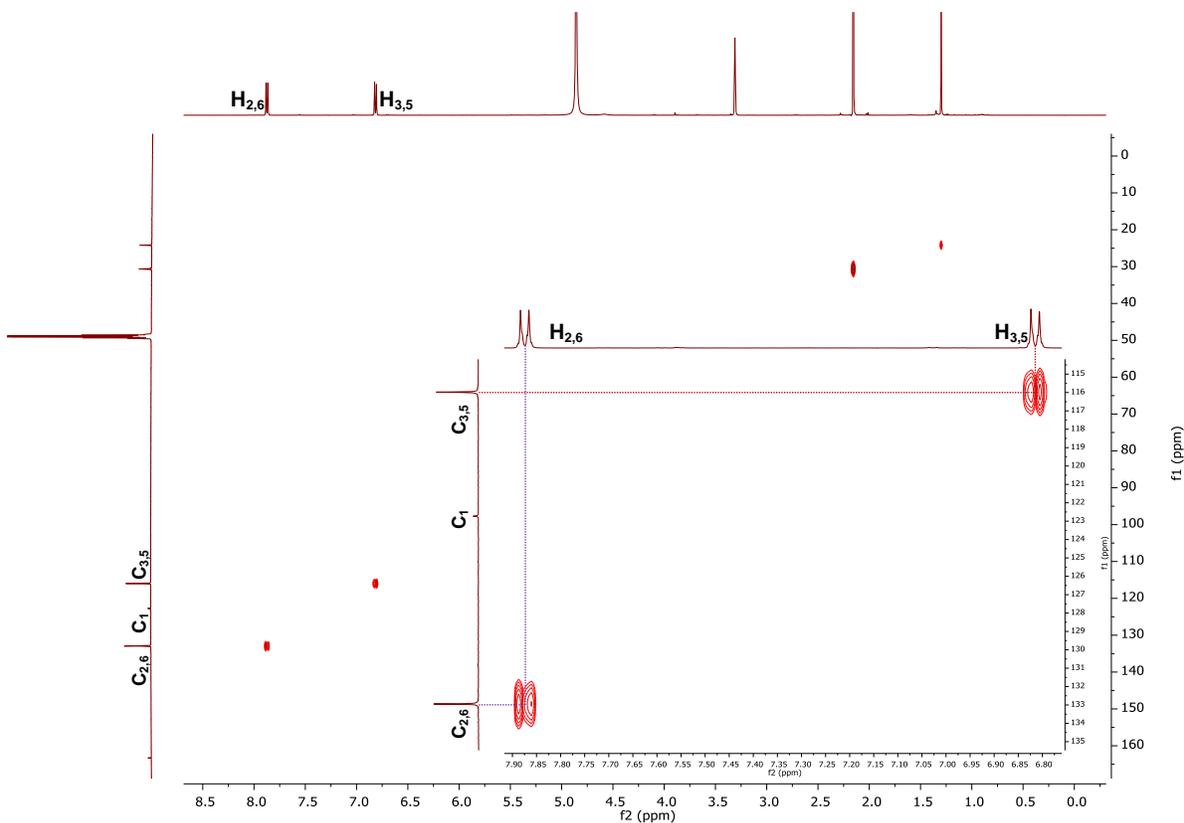
Espectro 7. ^1H RMN (600 MHz, Metanol- d_4) del ácido 4-hidroxibenzoico.

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan 5 señales, espectro 8, de las cuales 3 pertenecen a carbonos cuaternarios (δ 170.06, 163.31, 122.73) y dos metinos aromáticos (δ 132.95, 115.98).



Espectro 8. ^{13}C RMN (150 MHz, Metanol- d_4) del ácido 4-hidroxibenzoico..

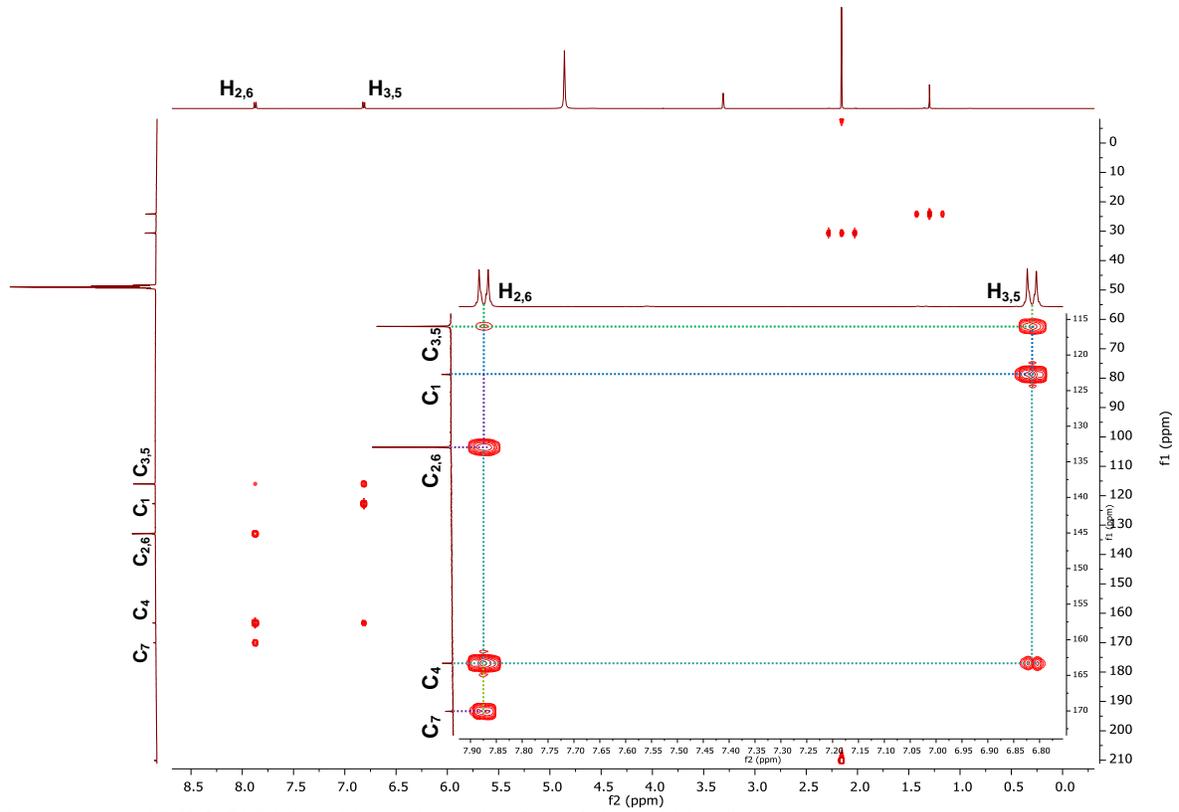
A través del experimento bidimensional HSQC, espectro 9, permite asignar de manera inequívoca las correlaciones heteronucleares C-H a una ligadura, donde $\delta_{\text{C}_2,\text{C}_6}$ 132.95/ δ_{H} 7.87 y $\delta_{\text{C}_3,\text{C}_5}$ 115.98 / δ_{H} 6.82 Hz.



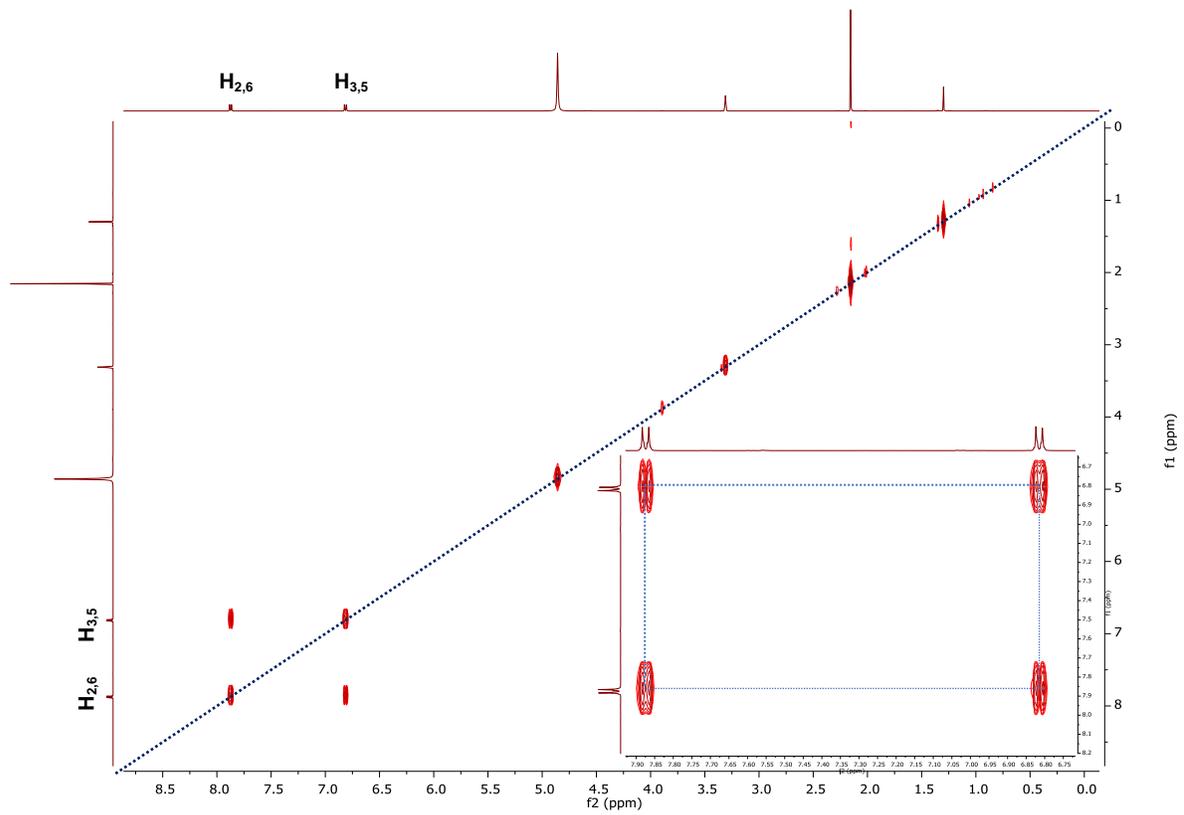
Espectro 9. HSQC RMN (600 MHz, Metanol-d4 del ácido 4-hidroxibenzoico..

Mediante el experimento HMBC, espectro 10, fue posible asignar la correlación a 3J entre la señal de carbono cuaternario en δ_{C5} 170.06 con los protones en δ_H 7.87. La señal de carbono en δ_{C4} 163.31 correlaciona a 3J con los metinos en $\delta_{H2-2'}$ 7.87 y a 2J con los metinos en $\delta_{H3-3'}$ 6.82, con los cuales la señal en δ_{C1} 122.73 correlaciona también a 2J . Los carbonos simétricos en δ 115.98 correlacionan a 2J con los protones en $\delta_{H2-2'}$ 7.87, y los carbonos simétricos en δ 132.95 correlacionan a 2J con la señal de los metinos en $\delta_{H3-3'}$ 6.82.

Por otra parte, el experimento COSY confirman el sistema de espines aromáticos, permitiendo asignar la resonancia mediante cruces de $\delta_{H3-3'}$ 6.82 (d, 2H, $J = 8.69$ Hz) con $\delta_{H2-2'}$ 7.87 (d, 2H, $J = 8.67$ Hz), ver espectro 11.



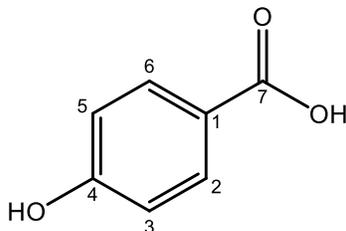
Espectro 10. HMBC RMN (600 MHz, Metanol-d₄) del ácido 4-hidroxibenzoico.



Espectro 11. COSY RMN (600 MHz, Metanol-d₄) del ácido 4-hidroxibenzoico.

Acorde con los resultados espectroscópicos, se ha identificado al compuesto presente en la reunión Q04 como el ácido 4-hidroxibenzoico, (Tabla 27), dicho compuesto presenta una amplia actividad biológica como antioxidante (Chen et al., 2020; Muangsri et al., 2022), antiinflamatorio (Xu et al., 2021), actividad estrogénica (Nguyen et al., 2022), antidiabético (Lee & Lee, 2021), anticancerígeno (Myint et al., 2021).

Tabla 27. Resultados RMN 1D y 2D del ácido 4-hidroxibenzoico.



No. C	δ C	-	HSQC	HMBC
1	122.73	C	-	C2, C6
2-6	132.95	CH	δ 7.87 (d, 2H, $J = 8.67$ Hz)	C3, C5
3-5	115.98	CH	δ 6.82 (d, 2H, $J = 8.69$ Hz)	C2, C6
4	163.31	C	-	C2, C3, C5, C6
7	170.06	C	-	C2, C5

7.5 Análisis y Caracterización de Encapsulados

7.5.1 Microcápsulas de Alginato de Sodio

El extracto etanólico de huitlacoche cocido (E.E.H.C.) y huitlacoche fresco (E.E.H.F.) a concentraciones de 1 %, 1.8 % y 2.5 % que se encapsularon en alginato de sodio (A.S) con las siguientes concentraciones: 1%, 1.5% y 2%.

En primera instancia, se realizaron vehículos de alginato de sodio (V.A.S.) para observar su comportamiento al aumentar la concentración de este, presentando una tendencia creciente en su tamaño y mejorando su uniformidad conforme la concentración subía, como se puede observar en la Figura 26. Esta tendencia estaría relacionada con la viscosidad, donde al haber una mayor presencia de bloques G (α -L-guluronato) da pie a un mayor número de interacciones con el ion Ca^{2+} con los que forman monocomplejos, conllevando al apareamiento de estos lo que conduce a la formación y propagación de dímeros de caja de huevo que a su vez tienen una asociación lateral para generar multímeros.

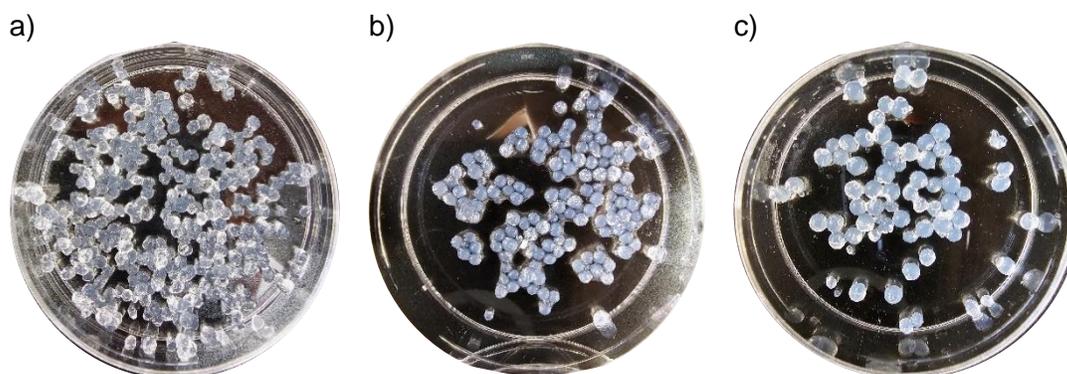


Figura 26. Cápsulas de alginato a una concentración de a) 1%, b) 1.5 %, c) 2%

Por otro lado, durante la elaboración de los V.A.S. con extracto, se observó que no hay alguna interacción aparente entre estos que predisponga a una gelificación ionotrópica temprana, ya que se requiere la presencia de iones divalentes (Ca^{2+}) para dar paso a la formación de los complejos de caja de huevo mediante *crosslinking* siendo este extracto un recurso de baja concentración de calcio, que para tener esa transición sol-gel, la fuente de iones Ca^{2+} proviene del CaCl_2 .

El V.A.S. de huitlacoche se muestran en la Figura 27. Dentro de las concentraciones empleadas de A.S., las más viables son las de 1.5% y 2% descartando aquella de 1% por presentar una deshidratación más rápida en el medio posterior a su obtención.

a) E.E.H.C. 1% - A.S. 1%,



E.E.H.C. 1% - A.S. 1.5%



E.E.H.C. 1% - A.S. 2%



b) E.E.H.C. 1.8% - A.S. 1%



E.E.H.C. 1.8% - A.S. 1.5%



E.E.H.C. 1.8% - A.S. 2%



c) H E.E.H.C. 2.5% - A.S. 1%



E.E.H.C. 2.5% - A.S. 1.5%



E.E.H.C. 2.5% - A.S. 2%



a) E.E.H.F. 1% - A.S. 1%,



E.E.H.F. 1% - A.S. 1.5%



E.E.H.F. 1% - A.S. 2%



b) E.E.H.F. 1.8% - A.S. 1%



E.E.H.F. 1.8% - A.S. 1.5%



E.E.H.F. 1.8% - A.S. 2%



c) E.E.H.F. 2.5% - A.S. 1%



E.E.H.F. 2.5% - A.S. 1.5%



E.E.H.F. 2.5% - A.S. 2%



Figura 27. Cápsulas de alginato-extracto de huitlacoche

7.5.1.1 Caracterización Morfológica Mediante Microscopia Óptica.

Las cápsulas obtenidas a partir de la formulación *alginato de sodio + extracto de huitlacoche* fueron observadas al microscopio (Radical modelo RXL-4B; lente x10). La superficie del encapsulado dispone de una morfología similar, en forma esférica y ovalada, con bordes regulares y definidos para aquellas muestras **b, d, f, h, m, o, q**, ver imagen 29.

Características que no muestran los otros V.A.S.-E.E.H. (**a, c, e, g, i, j, k, l, m, n, ñ**) donde sus bordes son irregulares, y su superficie presenta deformación estructural.

Siguiendo con el análisis, se diseccionaron para analizar su interior, (Figura 28); se observan bordes regulares, definidos y concisos a las concentraciones E.E.H. 1% - A.S. 1%, E.E.H.1% - A.S. 1.5%, E.E.H. 1.8% - A.S. 1%, E.E.H. 1.8% - A.S. 1.5% y E.E.H. 1.8% - A.S. 2%.

Asimismo, en estas mismas concentraciones se tiene una cavidad definida en la región interna lo que sería el núcleo del vehículo; por otro lado, en las concentraciones de extracto al 2.5% con A.S. al 1%, 1.5% y 2% encontramos al interior de estas una ausencia de núcleo por la ocupación del complejo A.S.-E.E.H. por lo que no se cuenta con bordes definidos.

Dentro de las concentraciones empleadas del biopolímero, la más viable en cuanto a sus características es la de 1.5%, si bien aquellos V.A.S. con 1% de A.S. presentan puntos favorables previamente mencionados, tienen el inconveniente de deshidratarse rápido previo a su almacenamiento.

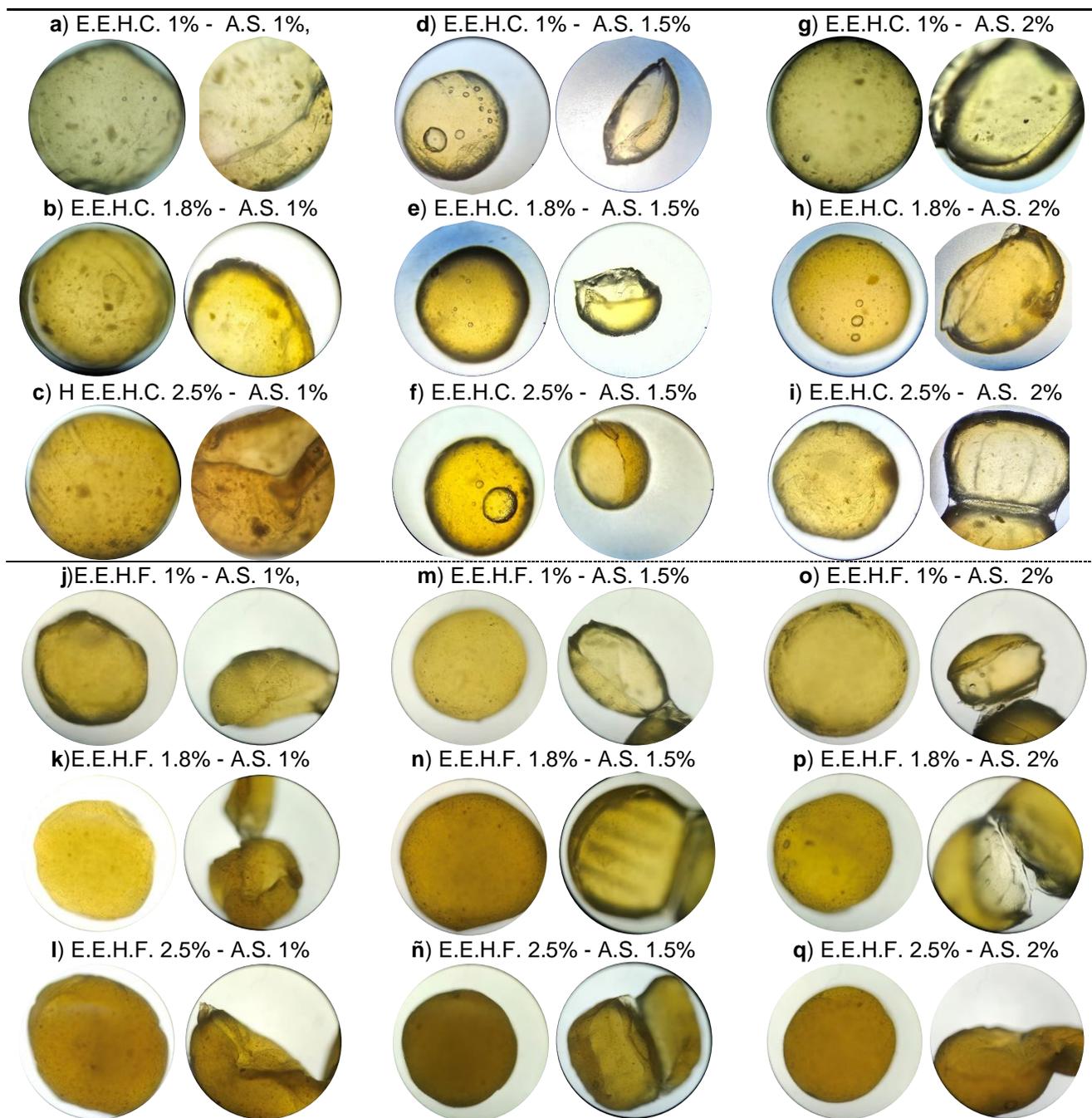


Figura 28. Tomas de microscopía óptica de las microcápsulas de alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche cocido y alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche fresco a distintas concentraciones de extracto (1%, 1.8%, 2.5%) y alginato de sodio (1%, 1.5%, 2%); magnificación de 10x

7.5.1.2 Determinación de Tamaño Mediante Microscopía Estereoscópica.

La evaluación del tamaño de los encapsulados de alginato de sodio con extracto de huitlacoche por estereomicroscopio permite tener una percepción con profundidad en el campo de visión.

En la Figura 29 se observan las fotografías obtenidas del microscopio de los encapsulados de alginato con huitlacoche cocido, los encapsulados con la concentración de 1% de A.S. presentan una morfología similar con un perímetro casi uniforme y en su superficie se aprecian irregularidades esto en aquellas con una concentración de extracto del 1% y 1.8%. En la última concentración los encapsulados exhiben aglomeración que contrasta a las formas semi-esféricas.

Para el caso específico de aquellas con una concentración de alginato de sodio del 1.5%, tienen características similares a aquellas de menor porcentaje de alginato. Observando que hay una mejoría en el contorno entre cada uno de los encapsulados, debemos mencionar que este incremento del polímero evitó una deshidratación temprana.

En ciertas fotografías se pueden observar que algunos vehículos tienen forma de cometa, característica típica de estos procesos de encapsulación donde esa pequeña protuberancia es parte de lo último que sale de la aguja e interacciona con el calcio antes de que se rompa esa tensión molecular entre la aguja y la gota.

Las cápsulas con concentración de 2% de A.S. presentan una mejor morfología en todas las concentraciones de extracto; sin embargo, a simple vista es notorio el crecimiento del tamaño de estas, punto que se aborda a continuación.

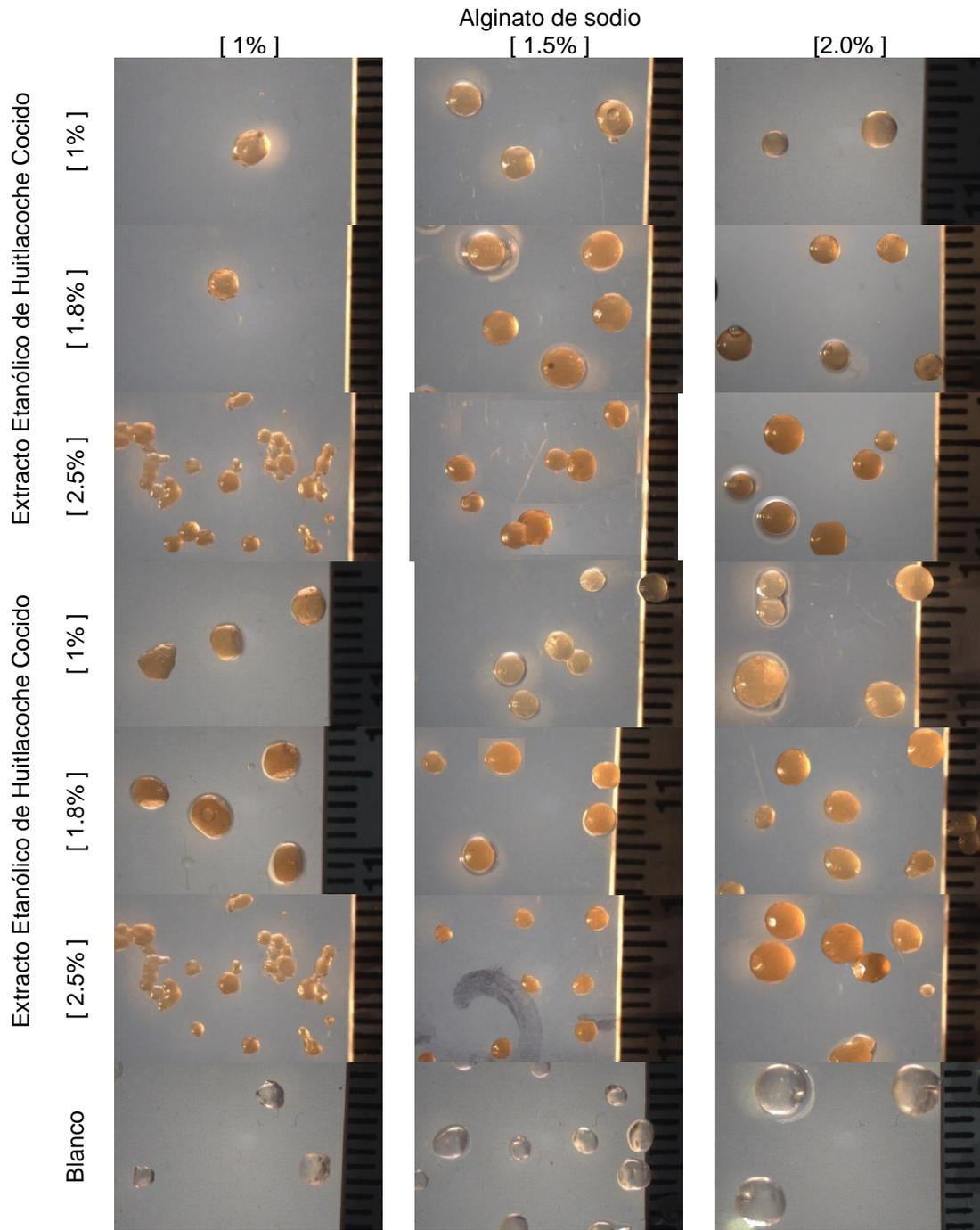


Figura 29. Tomas de microscopia estereoscópica de las microcápsulas de alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche cocido y alginato de sodio – extracto etanólico de huitlacoche fresco a distintas concentraciones de extracto (1%, 1.8%, 2.5%) y alginato de sodio (1%, 1.5%,2%); magnificación de 10x, enfoque 0.63

La medición de los encapsulados de los extractos etanólicos y sus respectivos blancos mediante el software ImageJ se muestran en la gráfica 8. Los blancos de alginato de sodio su límite inferior es de 1.186 ± 0.283 mm y en su límite superior de 2.53 ± 0.287 mm, siendo la concentración de 1.5% la de menor tamaño.

En cuanto al tamaño en específico para aquellas partículas con extracto de huitlacoche cocido y a una concentración de A.S. del 1%, se encuentran en el rango de 1.279 ± 0.374 mm a 1.527 ± 0.605 mm que acorde al análisis ANOVA ($P < 0.05$), (Tabla 28), no cuentan con una diferencia significativa entre ellas .

Tabla 28. Resultados del estudio de análisis de varianza unidireccional ANOVA

	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Tratamiento (entre columnas)	69.89	20	3.494	F (20, 457) = 18.55
Residual (dentro de las columnas)	86.07	457	0.1883	
Total	156.0	477		

Siguiendo con esta concentración del polímero encapsulante, con el extracto de huitlacoche fresco (H.F.) su rango de tamaño es 2.38 ± 0.426 mm a 2.735 ± 0.248 donde la concentración a 2.5% de extracto cuenta con el tamaño contenido en contraste a los demás, y si tiene una diferencia significativa con las de huitlacoche cocido.

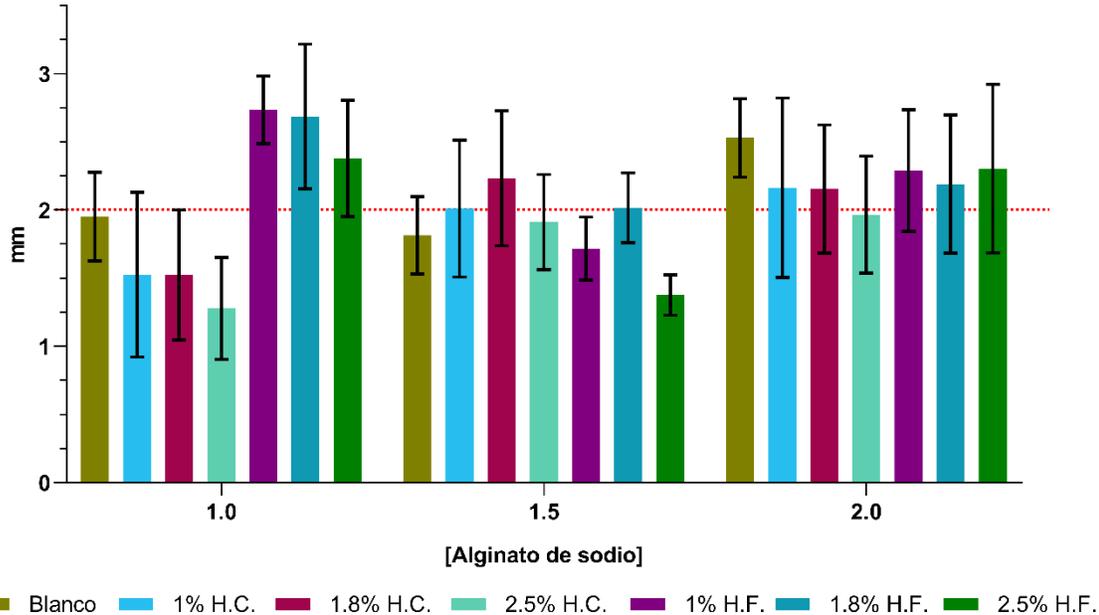
Al aumentar el A.S. a 1.5% vemos que para el huitlacoche cocido el tamaño de sus vehículos en sus tres concentraciones de extracto ronda entre los 1.91 ± 0.349 mm a los 2.233 ± 0.495 mm y no hay diferencia significativa entre ellas.

En contraste, el diámetro de las de H.F. está entre 1.37 ± 0.148 mm y 2.017 ± 0.257 mm donde la de menor valor promedio son las de H.F. al 2.5%, mencionando que también no poseen una diferencia significativa entre ellas. Donde sugiere el análisis estadístico que existe una diferencia significativa entre el H.F. al 2.5% con aquellas de A.S.(1.5%)-H.C. al 1.8% y 2.5%

Continuando con el presente análisis, observamos que en la última concentración de alginato de sodio (2.5%) el diámetro de los encapsulados de H.C. se encuentran dentro de un rango de 1.966 ± 0.43 mm y 2.165 ± 0.658 mm que para el H.F. su límite inferior es 2.191 ± 0.507 mm y el límite superior de 2.305 ± 0.618 y su análisis estadístico para ambos extractos no existe una diferencia significativa entre ellos.

Ahora bien, la literatura menciona que las microcápsulas tienen un tamaño que va desde los 50 nm a 2 mm, (Singh et al., 2010), lo que permite denominar a nuestros vehículos de alginato con este término al encontrar el tamaño de estos dentro del rango que se menciona.

Alginato de sodio - Extractos de huitlacoche



Gráfica 8 Tamaños de las microcápsulas a diferentes concentraciones de A.S. - E.E.H..

Analizando los tamaños de las microcápsulas, ver Tabla 29, observamos que para aquellos encapsulados con A.S. al 1% disminuye el tamaño de estas conforme incrementa la concentración de extracto, los vehículos con extracto de H.C. son de menores dimensiones que aquellos que concentran extracto de H.F.

Esta tendencia está presente de igual forma en las microcápsulas con A.S. al 1.5% pero por lo contrario a los de 1%, los que contienen extracto de H.C. tienen un tamaño superior que aquellos con extracto de H.F., oscilando entre 0.2 y 0.6 mm.

En aquellos donde están hechos con A.S. al 2%, se observa un crecimiento en tamaño conforme la concentración de extracto de huitlacoche aumenta, la diferencia de tamaño entre ellas se coloca en un rango entre 0.04-0.4 mm.

La oscilación de tamaño de los V.A.S. con extracto conforme varían las concentraciones de ambos, puede estar relacionado con la posible interacción de los compuestos presentes en los extractos con los iones divalentes o con el propio biopolímero, propiciando esta variabilidad de dimensiones.

Tabla 29. Tamaño de los microencapsulados de los extractos de huitlacoche.

Alginato (%)	Tamaño de capsula						
	Concentración de extractos						
	Blanco	1% H.C	1% H.F.	1.8% H.C.	1.8% H.F	2.5% H.C.	2.5% H.F.
1	1.951±0.326	1.527±0.605	2.735±0.248	1.523±0.477	2.687±0.532	1.279±0.374	2.38±0.426
1.5	1.816±0.283	2.012±0.503	1.718±0.231	2.233±0.495	2.017±0.257	1.913±0.349	1.377±0.148
2	2.53±0.287	2.165±0.658	2.291±0.447	2.155±0.471	2.191±0.507	1.966±0.43	2.305±0.618

Ahora bien, se tiene registro del empleo de este biopolímero para encapsular extractos como el extracto etanólico de *Eryngium billardieri*, extracto fenólico de *Spirulina sp.*, extracto acuoso de *Mesona chinensis* (Abtahi et al., 2024; Machado et al., 2022; Wongverawattanakul et al., 2022).

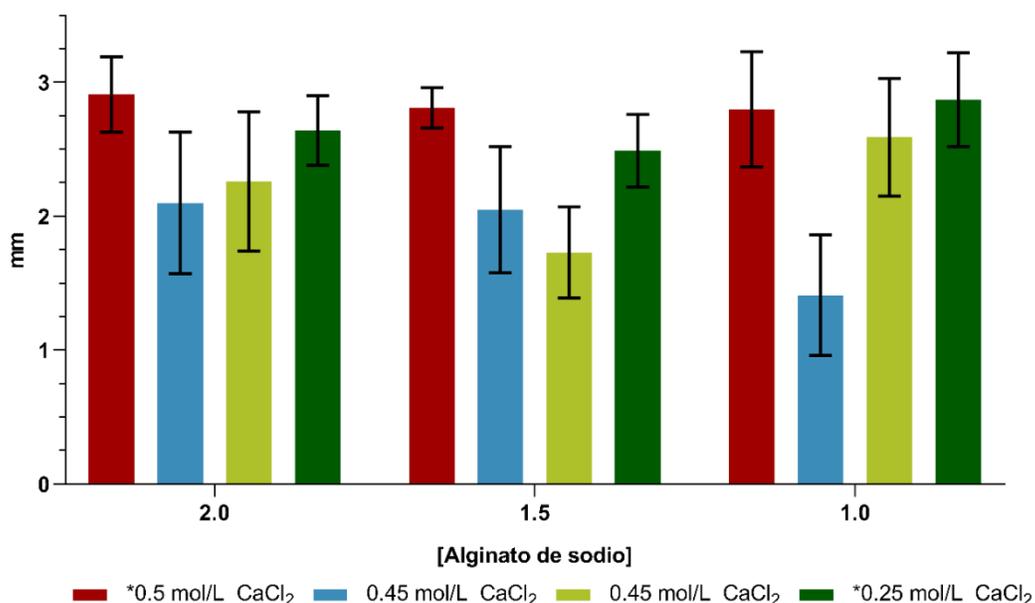
En el caso de la encapsulación del extracto acuoso de la planta *Mesona chinensis* Benth. en el equipo de trabajo de (Wongverawattanakul et al., 2022). donde los encapsulados tienen una dimensión de $1516,67 \pm 40,96 \mu\text{m}$ (1.51 mm) que en contraste a su blanco ($792,33 \pm 26,12 \mu\text{m} = 0.79 \text{ mm}$) representa un aumento de dimensión.

El tamaño de estos vehículos se encuentra por debajo de aquellas realizadas en este proyecto, teniendo aproximadamente 1.2 mm de diferencia; sin embargo, otras se colocan por debajo de las microcápsulas de *Mesona chinensis* siendo 0.24 mm más pequeñas.

Otro caso de estudio, es el que presenta (Abtahi et al., 2024) con la encapsulación del extracto etanólico de *Eryngium billardieri* empleando una concentración única de alginato al 1%, el rango de tamaño se encuentra entre 150–170 μm . Que para las microcápsulas de extracto de huitlacoche a una concentración de alginato del 1% poseen dimensiones superiores que oscilan entre los 1109 μm y 2565 μm en contraste a lo reportado Abtahi.

Al equiparar las dimensiones de estos capsulados con los obtenidos por el equipo de trabajo de (Machado et al., 2022), ver gráfica 9.

Observamos que en su estudio al variar la concentración de cloruro de calcio ($1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $0.5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $0.25 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$) el tamaño de las cápsulas incrementa conforme este aumenta, tendencia que ocurre en las tres concentraciones de alginato (1%, 1.5%, 2%).



Gráfica 9. Comparativa de tamaños de microcápsulas a diferentes concentraciones de CaCl₂ y alginato

Las dimensiones de estos V.A.S. se colocan dentro del rango de 2.49 ± 0.27 mm a 3.33 ± 0.42 mm encontrándose por arriba de las obtenidas en el presente donde va de 1.41 ± 0.45 mm a 2.59 ± 0.44 mm, considerando que la concentración usada es de $0.45 \frac{mol}{L}$.

Analizando y equiparando los resultados de esas concentraciones de $0.5 \frac{mol}{L}$, $0.45 \frac{mol}{L}$ y $0.25 \frac{mol}{L}$ vemos que nuestros encapsulados de extracto de huitlacoche se colocan por debajo del tamaño que aquellas con extracto fenólico de *Spirulina sp.* Cuando concentración de A.S. es del 1%, sus tamaños a las concentraciones de análisis de CaCl₂ varían del 2.80 ± 0.43 mm a 2.87 ± 0.35 mm en su contraparte los V.A.S.-huitlacoche tienen un tamaño promedio que va del 1.41 ± 0.45 mm a 2.59 ± 0.44 mm estando así entre 0.28 a 1.40 unidades por debajo,

En su contraparte, a una concentración de alginato del 1.5% el tamaño ronda los 2.49 ± 0.27 a 2.81 ± 0.15 mm donde los encapsulados de H.C. y H.F tienen una dimensión del 2.05 ± 0.47 mm y 1.73 ± 0.34 mm.

Por último, con una concentración del 2% de A.S. crece el tamaño de los V.A.S.-extracto *Spirulina sp.* (2.64 ± 0.26 mm y 3.33 ± 0.42 mm) conforme aumenta la concentración de CaCl₂. Mostrando un mayor tamaño con aquellos con extractos de huitlacoche con una dimensión de 2.10 ± 0.53 mm y 2.26 ± 0.52 mm.

7.5.2 Microcápsulas de Quitosano

7.5.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido.

El extracto etanólico de huitlacoche cocido y el extracto de huitlacoche fresco a concentraciones de 1%, 1.8% y 2.5% se encapsularon empleando quitosano al 0.01% y 0.05%. Los vehículos de quitosano- extracto de huitlacoche (QTS-E.H. 0.01%:2.5%); se observaron mediante microscopia electrónica de barrido (MEB),

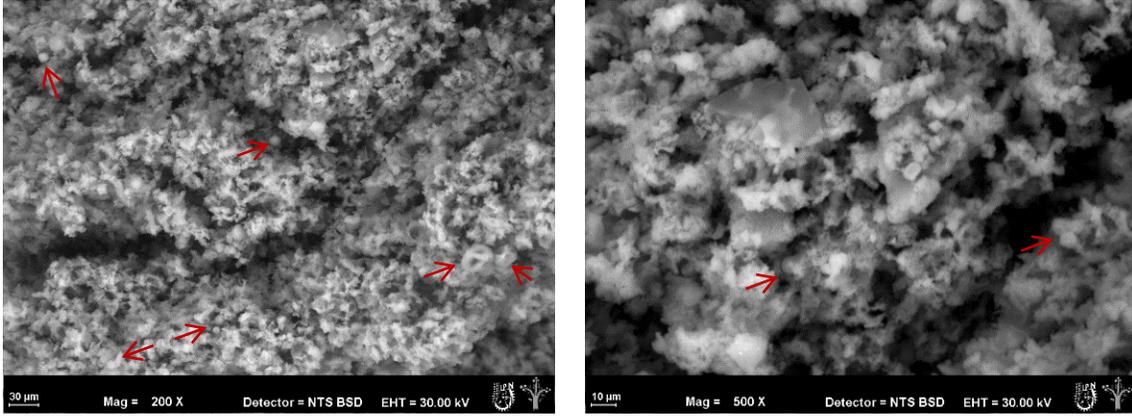
Las fotografías obtenidas en dicha técnica se muestran en la Figura 30, haciendo un análisis detallado se encontró con encapsulamientos depositados sobre la superficie y en los poros dichos vehículos se señalan con una flecha. En la Figura 30A, las partículas QTS-E.H.F. tienen una morfología parcialmente esférica, con superficies variadas (lisas, rugosas, porosas), caso contrario para QTS-E.H.C., (Figura 30B), donde se observa una partícula esférica depositada sobre la superficie de un artefacto planar de quitosano.

Continuando con el estudio, los tamaños de las partículas se determinaron mediante el uso del software ImageJ, los encapsulados de QTS-E.H.F. tienen un rango que va de los 6.1 μm hasta los 13.9 μm con un promedio de $9.42 \pm 2.69 \mu\text{m}$, en el caso de QTS-E.H.C. tiene un tamaño de 11.93 μm .

Ahora bien, en cuanto a los reportes de encapsulación de extractos con quitosano analizados por MEB, encontramos la investigación de (Phupaboon et al., 2022) en el que emplearon extractos de *Cannabis sativa L.*, *Cannabis indica L.*, and *Mitragyna speiosa K.* cuyo tamaño de vehículos oscilaba entre 0.72 a 11 μm , donde el tamaño de nuestros vehículos se localizan dentro del rango superior. De igual forma, los resultados que expone (Safitri et al., 2022) en su trabajo de la microencapsulación del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa L.* donde el tamaño promedio de estos es de 53.41 μm , lo que nos da un panorama indicándonos que nuestros vehículos se posicionan en el rango de tamaños de microcápsulas,

La estructura del biopolímero entre ambas concentraciones de quitosano ($\Lambda=0.01\%$ y $\beta=0.05\%$), muestran una tendencia morfológica diferente

a) Quitosano – Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (ΔF) (0.01%-2.5%)



b) Quitosano – Extracto Etanólico de Huitlacoche Cocido (βC) (0.01%-2.5%)

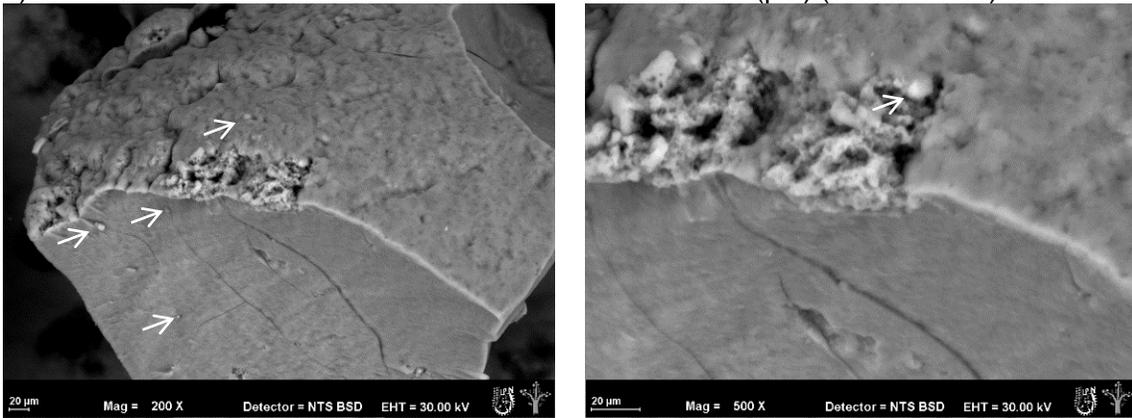


Figura 30. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de microcápsulas de a) Quitosano – Extracto Etanólico de Huitlacoche Fresco (ΔF) (0.01%-2.5%), b) Quitosano – Extracto Etanólico de Huitlacoche Cocido (βC) (0.01%-2.5%); a una magnificación de 200x y 500x y una barra de escala de 20 μm

7.5.2.2 Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)

El análisis para los encapsulados de QTS-E.E.H. (0.01%-1.8%) mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM), podemos observar las capturas obtenidas en la Figura 31.

Para la muestra Quitosano-E.E.H.C (**AC**), al incidir el láser a una $\lambda=405$ nm se genera una autofluorescencia azul cuya intensidad es casi nula en la superficie y poros, en su contraparte, en **AF** observamos que es más visible las áreas de emisión, donde este color azul observado puede ser generado por algunos metabolitos de tipo ácido cinámico (ferúlico y cumárico) o alcaloides, (Razgonova et al., 2022; Talamond et al., 2015)

Bajo una $\lambda=488$ nm se genera una autofluorescencia verde que se extiende sobre la superficie exterior de la muestra además en las cavidades de la misma, en la situación del analito **AF** tiene mayor presencia en la superficie analizada, esta emisión de color rojo se sugiere que son metabolitos de tipo flavinas, flavonoides y algunos terpenoides, (Razgonova et al., 2022; Talamond et al., 2015).

En cambio, al cambiar la $\lambda=640$ nm la autofluorescencia roja en la muestra **AC** es prácticamente nula en contraste a la muestra **AF**, el área de esta es muy similar a aquella de la que se observa a una $\lambda=488$ nm. Que acorde a la literatura, se le atribuye esta emisión color rojo a la presencia de antocianinas y antocianidinas, (Razgonova et al., 2022; Talamond et al., 2015).

El sobreposicionamiento de estas longitudes se encuentra en anexos 10.10.

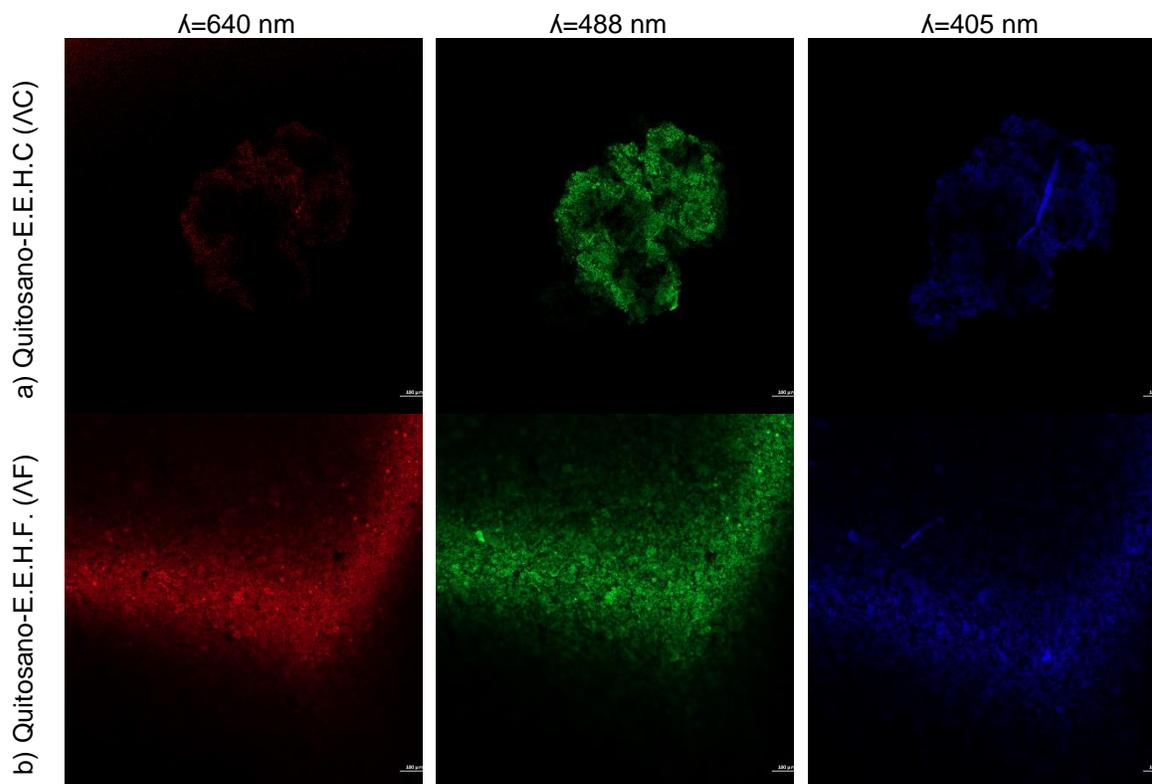


Figura 31. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Quitosano-E.E.H.C (AC) 0.01%:1.8%, b) Quitosano-E.E.H.F. (AF) 0.01%:1.8%; mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μm

No obstante, para el análisis de los vehículos de QTS -E.E.H. (0.05%-1.8 %) se muestran en la Figura 32 al incidir el láser a una $\lambda=405$ nm la autofluorescencia de color azul en βC y βF , el nivel de la señal de tiene un índice de cobertura superficial mucho menor, pero en βF hay una región donde es más nítido.

Al exponer la muestra βC y βF a una $\lambda=488$ nm apreciamos una autofluorescencia de intensidad moderada. En βF se mantiene la visualización de los encapsulados ya antes identificados, pero con la presencia de nuevos vehículos.

A una $\lambda=640$ nm en βC observamos que la autofluorescencia se extiende sobre una franja definida en la superficie. Para el caso de βF , mantiene la misma región de fluorescencia , observando la Figura 32B, los pequeños puntos señalados se infiere que son encapsulados, su tamaño se determinó con ImageJ indicando que tienen un tamaño promedio de 10.4 μm .

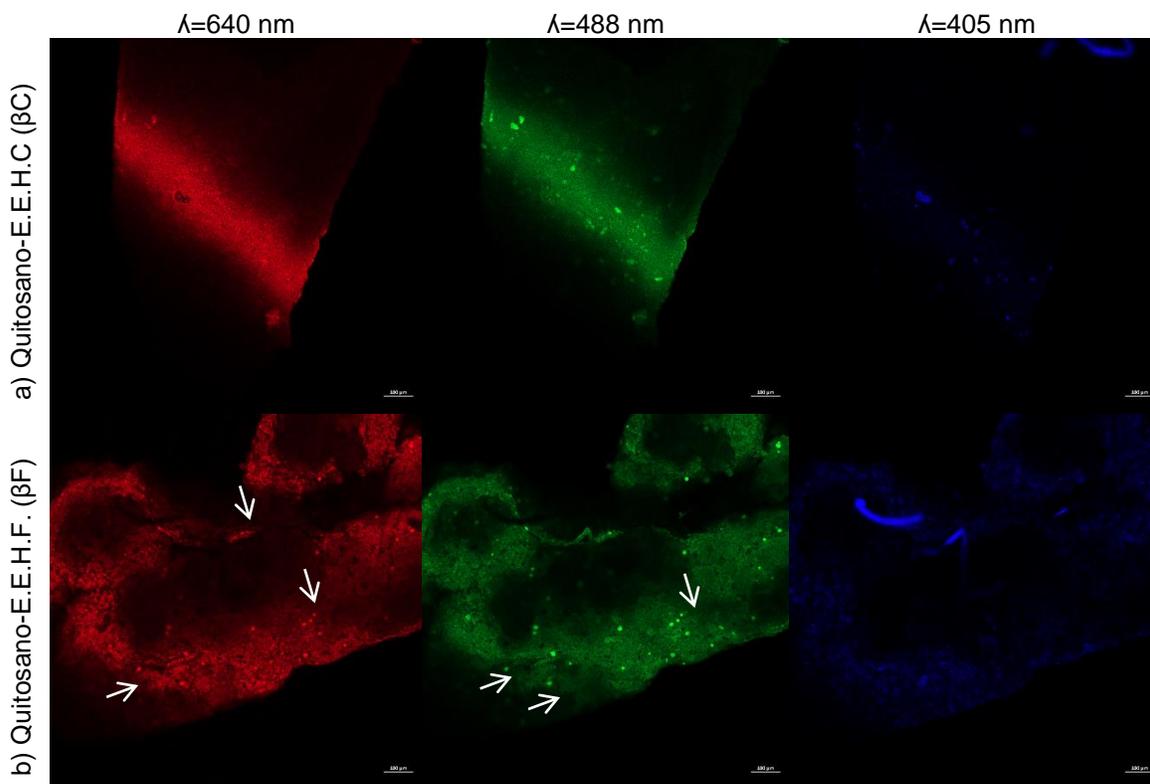


Figura 32. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Quitosano-E.E.H.C (βC) 0.05%:1.8%, b) Quitosano-E.E.H.F. (βF) 0.05%:1.8%; mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μm

7.5.3 Nanocápsulas de Quitosano

7.5.3.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Los encapsulados de los extractos etanólicos de huitlacoche empleando como matriz encapsulante al quitosano, se analizaron por microscopía electrónica de trasmisión.

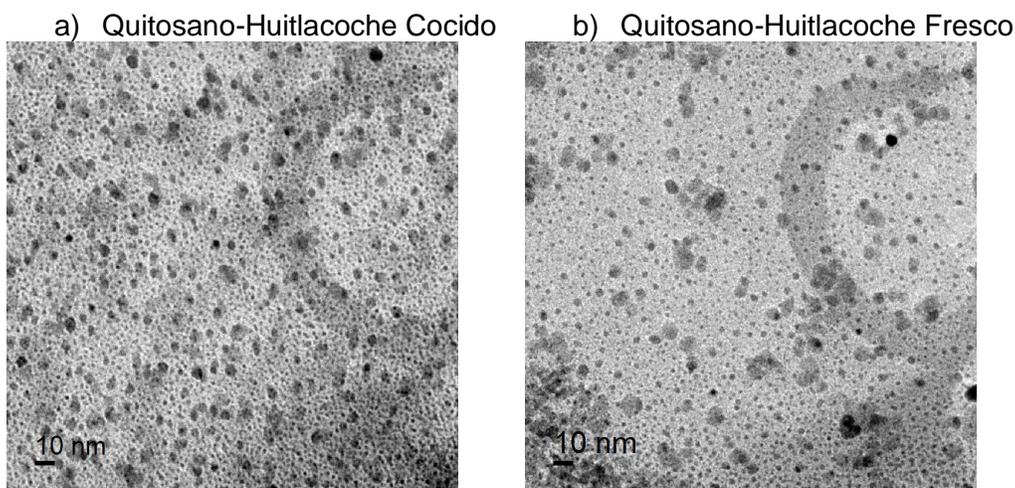


Figura 33. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) de los nanocapsulados de a) Quitosano-E.E.H.C (β C) 0.05%:1.8%, b) Quitosano-E.E.H.F (β F) 0.05%:1.8%, con una barra de escala de 100 μ m

Las nanopartículas observadas, (Figura 33), exhibieron una morfología esférica relativamente homogénea y una distribución de tamaño estrecha, va desde 1.5 a 6.5 nm; la medición del tamaño de los nanoencapsulados QTS-E.E.H.F. por ImageJ nos indica que tienen un tamaño promedio de 2.97 ± 1.53 nm por debajo de aquellos con extracto de huitlacoche fresco con un tamaño promedio de 3.13 ± 1.22 nm.

Dentro de la literatura para la nanoencapsulación extractos con QTS y analizados por MET hayamos reportes como el del equipo de (El-Naggar et al., 2022) donde las nanocápsulas (NC) de *Eucalyptus globulus* tuvieron un tamaño entre 6.92 and 10.10 nm siendo valores cercanos a los de este trabajo.

El estudio de (Alam et al., 2023) coloca a sus NC de QTS-extracto de *Sida cordifolia* con un tamaño promedio de 57.4 nm, en el caso de (Sathiyabama et al., 2024) con el extracto del té *Camellia sinensis* L. tuvieron un tamaño entre 25 nm 40 nm; dimensiones un poco superiores a las de los extractos de *Ustilago maydis*.

7.5.3 Microcápsulas de Alginato - Quitosano

7.5.3.1 Microscopia Electrónica de Barrido.

La vehiculización del extracto etanólico de huitlacoche cocido y el extracto de huitlacoche fresco a concentraciones de 1%, 1.8% y 2.5% empleando alginato de sodio al 1% y 1.8% además de quitosano al 0.01% y 0.05%.

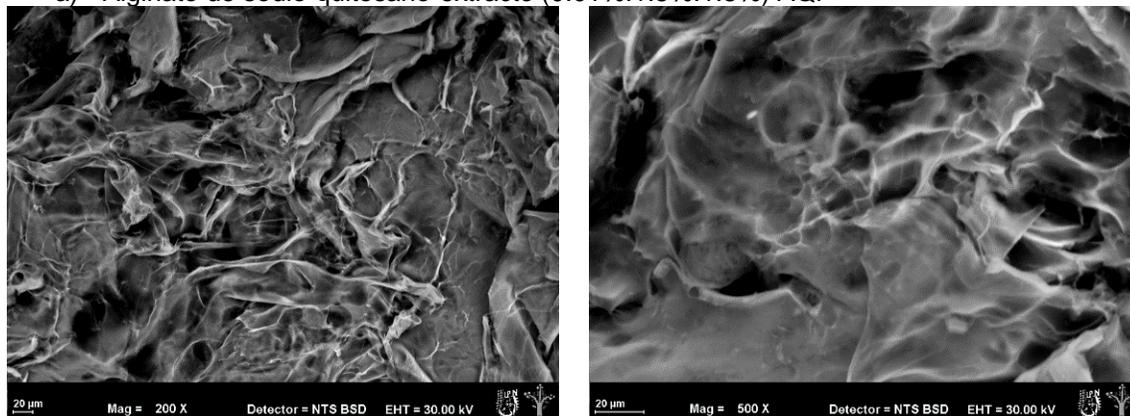
Los geles liofilizados de alginato de sodio-quitosano-huitlacoche fresco A.S.-QTS-H.F al 0.01%:1.5%:1.8% (**AQF**) y 0.01%:2.5%:1.8% (**ASF**) se observaron mediante microscopia electrónica de barrido (MEB).

Las fotografías obtenidas en MEB se muestran en la Figura 34, al analizarlas se observó una diferencia estructural donde **AQF** cuenta con una estructura superficial rugosa en contraste a la de **ASF** que es fibrosa y porosa, tales características son similares a lo reportado por (Baysal et al., 2013), aunado a esto, se encontraron encapsulamientos depositados sobre la superficie y en los poros de la estructura de **ASF**.

Este comportamiento estructural del complejo polielectrolítico puede ser atribuido a una mayor interacción entre las cadenas policatiónicas del quitosano con el *crosslinker tween* 80 pero de igual forma implica aquellas interacciones con las cadenas polianiónicas del alginato de sodio que corresponderían a los bloques G.

El tamaño de las partículas vistas en **ASF** se determinaron mediante el empleo del software ImageJ teniendo un diámetro promedio de 10.14 μm .

a) Alginato de sodio-quitosano-extracto (0.01%:1.5%:1.8%) Λ QF



b) Alginato de sodio-quitosano-extracto (0.01:2.5:1.8) Λ SF

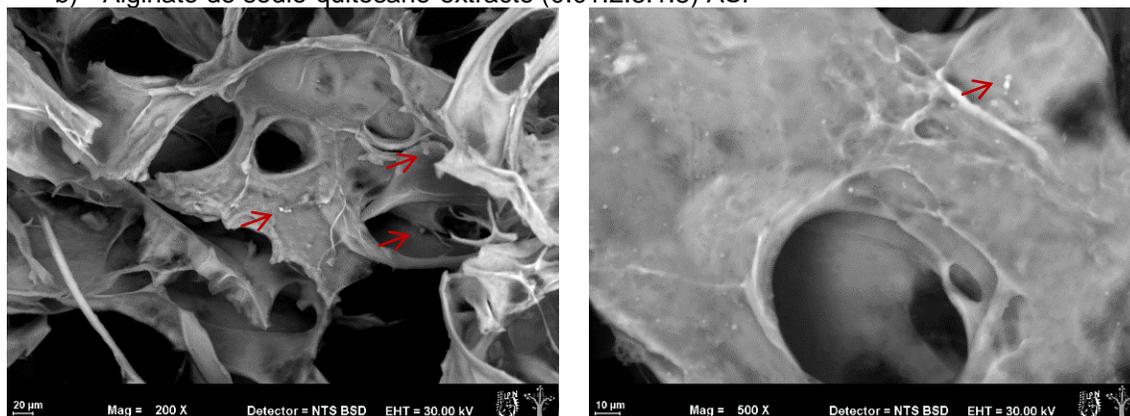


Figura 34. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de microcápsulas de a) Alginato de sodio-quitosano-extracto (0.01:1.5:1.8) Λ QF, b) Alginato de sodio-quitosano-extracto (0.01:2.5:1.8) Λ SF; a una magnificación de 200x y 500x y una barra de escala de 10 y 20 μ m

Por otro lado, en la literatura se ha reportado el uso de ambos tipos de polielectrolitos para la encapsulación de extracto fenólico de los residuos del vino y la encapsulación de antocianinas.

En el caso de los encapsulados de (Moschona & Liakopoulou-Kyriakides, 2018) ellos reportan un rango de tamaño que oscila entre los 1004 μ m a los 1070 μ m, quedando por arriba de los microencapsulados generados para los extractos de huitlacoche (10.14 μ m).

En su contraparte, el estudio presentado por (da Silva Carvalho et al., 2019) quienes encapsularon antocianinas a partir del extracto de la palmera jussara (*Euterpe edulis Martius*) sus microcápsulas tuvieron un diámetro promedio entre 1–1.2 mm superando a los vehículos de A.S.-QTS.-E.E.H.

7.5.2.2 Microscopía confocal de barrido láser (CLSM).

Las muestras de QTS-A.S.-H.C: **ΛQC** (0.01%:1.5%:1.8%), **ASC** (0.01%:2.0%:1.8%), **βSC** (0.05%:2.0%:1.8%), **βQC** (0.05%:1.5%:1.8%); y QTS-A.S.-H.F: **ΛSF** (0.01%:1.5%:1.8%), **βQF** (0.05%:1.5%:1.8%) fueron observadas en microscopia confocal.

Las fotografías de esta técnica se muestran en la Figura 35, en su análisis, estructuralmente se aprecia una variabilidad de grosor lo que está ligado el grado de transparencia observable, en esa misma línea estructural, se localizan sobre o entre la biomasa de QTS-A.S.-E.E.H vehículos con una morfología esférica y una superficie parcialmente lisa; mediante ImageJ se midió su diámetro, teniendo un promedio de 10.41 μm, con un rango que va desde los 7 μm a los 14 μm.

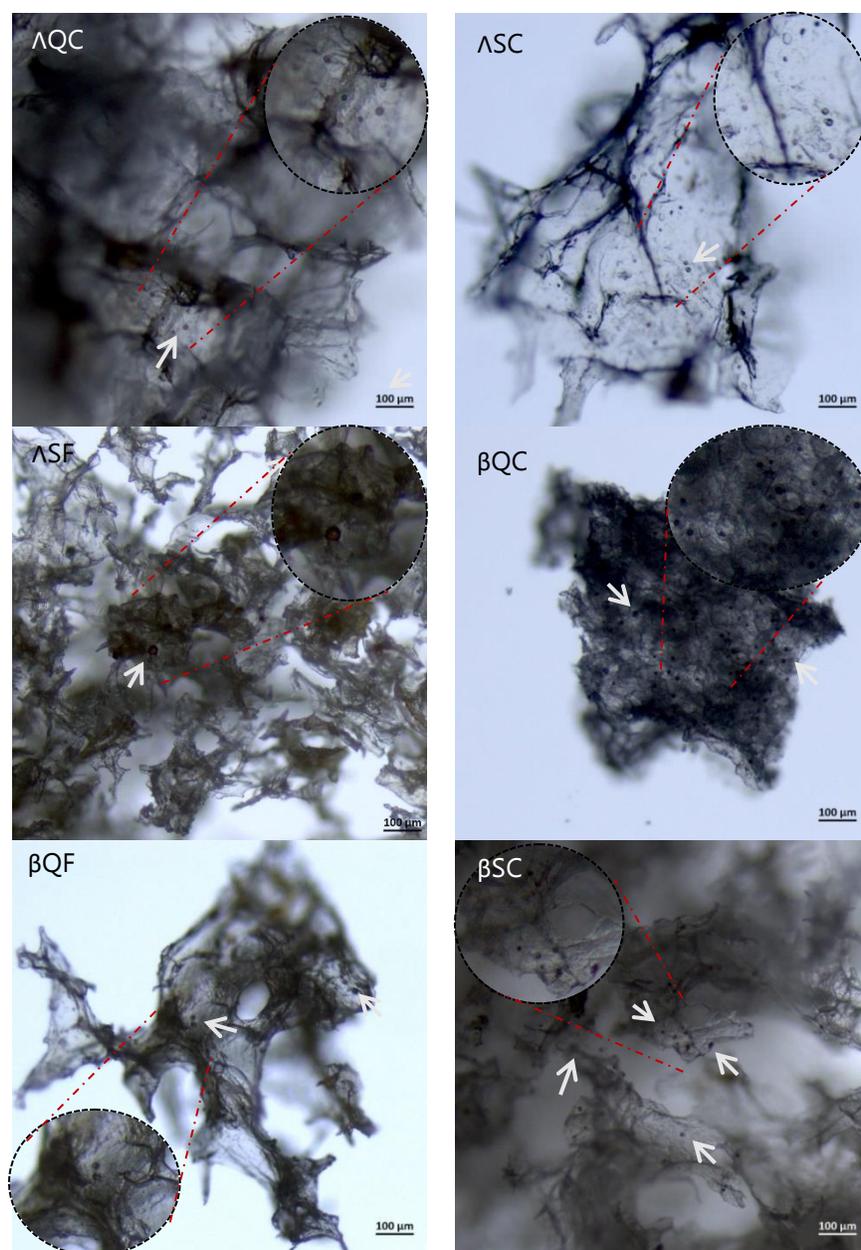


Figura 35 Micrografías de microscopía confocal de los encapsulados de a) Qtn/A.S./E.E.H.C (0.01-1.8.) y b) quitosano-E.E.H.F.

Ahora bien, las microcápsulas de QTS/A.S./E.E.H. cocido (c) y fresco (f) en las concentraciones de 0.01/1.5/1.8 (**ΛQC**), 0.01/2/1.8 (**ΛSC**), 0.01/2/1.8 (**ΛSF**) vistas vía microscopía confocal de barrido láser se muestran en la Figura 36. La detección de autofluorescencia con la luz verde a una $\lambda=488$ nm al 5 % de excitación en la muestra **ΛQC**, (Figura 36A), se observa con mayor predominancia en los contornos con un difuminado acentuado hacia los interiores de esta muestra.

Bajo esta misma luz, la muestra **ΛSC**, (Figura 36B), presenta la misma tendencia que la muestra **ΛQC**, la fluorescencia tiende a concentrarse en la zona central, logrando apreciar un cumulo de microcápsulas con un tamaño de 7.14 μm .

En el caso de la muestra de huitlacoche fresco **ΛSF**, la autofluorescencia se extiende en toda la analito variando de intensidad en ciertas zonas de esta, en ciertos puntos, se logra apreciar las microcápsulas que están incrustadas en el cumulo de quitosano/A.S y su tamaño promedio es de 7.76 μm .

La incidencia con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en la muestra **ΛQC** observamos una autofluorescencia de color roja que se observa en mayor grado de la superficie del analito prevaleciendo en zonas donde se percibió autofluorescencia color verde y autofluoresciendo en regiones donde no había registro, ver Figura 36B.

En la muestra **ΛSC**, la autofluorescencia color rojo abarca más regiones del analito pero con una intensidad más débil, y se logra detectar algunos encapsulados, (Figura 35B). La autofluorescencia de color rojo en el analito **ΛSF**, (Figura 36C), es de intensidad media en toda la superficie que tiende a disminuir en las cavidades. Es evidente la existencia de pequeñas áreas donde se resaltan más la presencia de encapsulados que previamente habían autofluorescido color verde.

Por último, la incidencia con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en estas mismas muestras dio lugar a la autofluorescencia color azul, en la muestra **ΛQC** y **ΛSC** existe un contraste considerable en cuanto al área de autofluorescencia previas, estas se localizan con mayor intensidad en los bordes de los analitos con una considerable degradación de la intensidad lumínica hacia los interiores del analito.

Esto se repite parcialmente en la muestra **ΛSF**, en las cavidades de esta la autofluorescencia es mucho menor en comparación a aquellas zonas superficiales y en las partes donde se tenía presencia de encapsulados estos no emitieron fluorescencia.

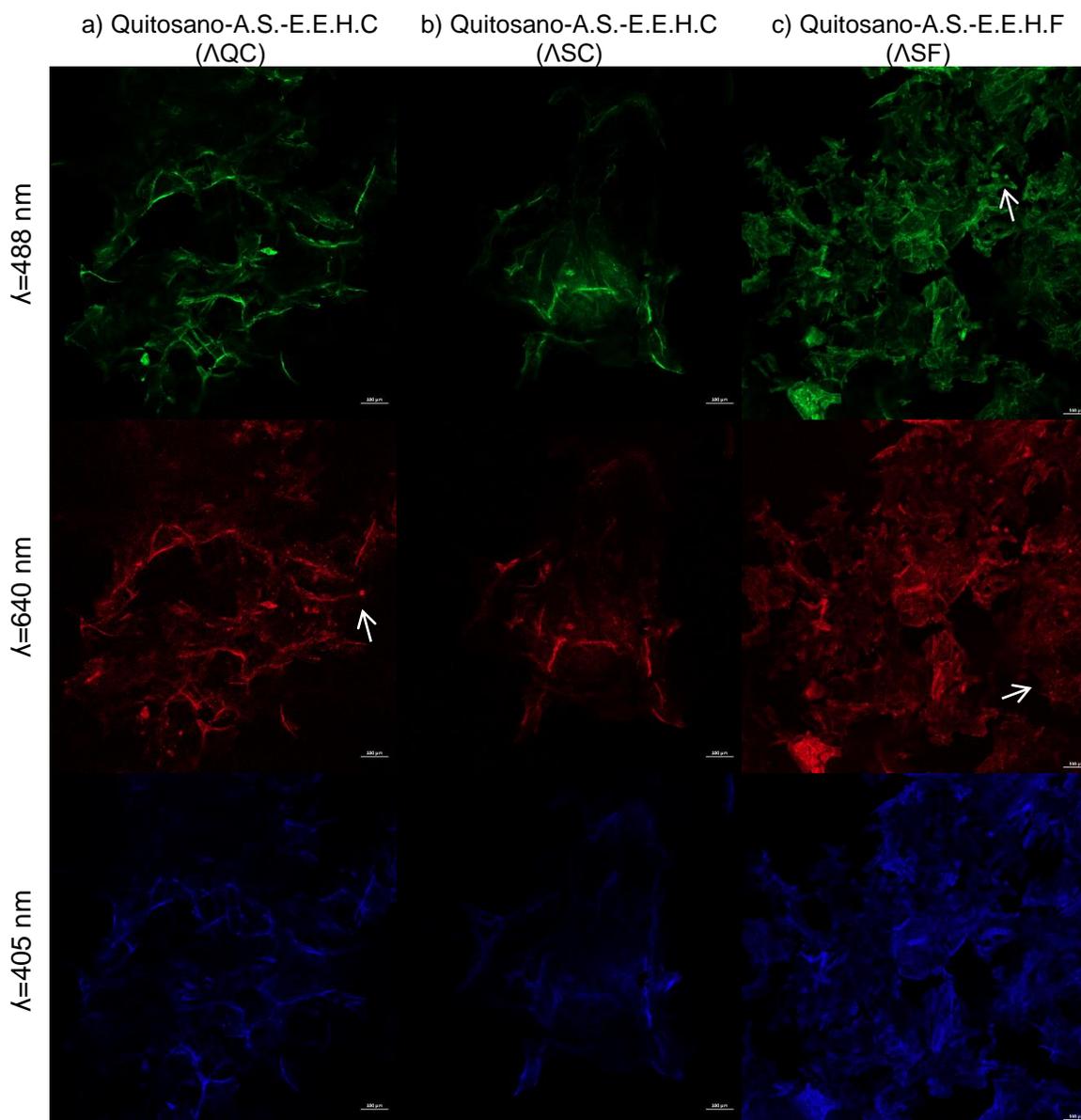


Figura 36. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Quitosano-A.S.-E.E.H.C (ΛQC) 0.01%:1.5%:1.8% b) Quitosano-A.S.-E.E.H.C (ΛSC) 0.01%:2.5%:1.8%, c) Quitosano-A.S.-E.E.H.F (ΛSF), 0.01%:2.5%:1.8%, mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μ m

Ahora bien, las microcápsulas de QTS/A.S./E.E.H. en las concentraciones de 0.05/1.5/1.8 (β QC), 0.05/2.5/1.8 (β SC), 0.05/1.5/1.8 (β QF) vistas vía microscopía confocal de barrido láser se muestran en la Figura 37.

La autofluorescencia color verde en la muestra β QC, (Figura 37A), se observa un par de regiones con una fluorescencia intensa, en el resto del analito esta se ve sumamente atenuada que en contraste a la muestra Λ QC.

Por lo contrario, en la muestra β SC, (Figura 37B), la percepción de distribución e intensidad de autofluorescencia es similar a Λ QC destacando unos pequeños cúmulos de encapsulados localizados en algunos puntos del analito.

En el análisis de β QF, ciertas microcápsulas se logran identificar por la autofluorescencia, que además se presenta cubriendo al analito variando de intensidad desde la superficie hasta las posibles cavidades del analito, estas características de autofluorescencia son parcialmente similares al Λ SF, (Figura 37C).

Pasando ahora a la autofluorescencia de color rojo en β QC, esta abarca toda la muestra habiendo una tendencia a disminuir el brillo en aquellas áreas donde era intenso en la autofluorescencia verde, ver Figura 37A. A esta longitud de onda, es posible localizar las microcápsulas a largo del analito que se ven como pequeños puntos intensos rojos.

En la Figura 37A, en la imagen del β SC la autofluorescencia roja se percibe con una intensidad moderada a lo largo del analito, pero en un grado menor de superficie hay regiones con una intensidad marcada. A esta longitud, permite la autofluorescencia de más cantidad de microcápsulas como puntos.

En β QF, la autofluorescencia roja presenta una distribución semejante a la vista con el laser a una $\lambda=488$ nm, (Figura 37C). Señalando que a lo largo de un área se ven una cantidad considerable de puntos rojos sugiriendo que son microencapsulados.

Por último, en la muestra β QC y β SC el área de autofluorescencia color azul es similar, estas se localizan con mayor intensidad en los bordes de los analitos con una considerable degradación de la intensidad lumínica hacia los interiores del analito.

Para la muestra β QF, la autofluorescencia es mucho menor en comparación en la $\lambda=488$ nm y 640 nm en zonas superficiales pero se mantiene en las orillas del analito.

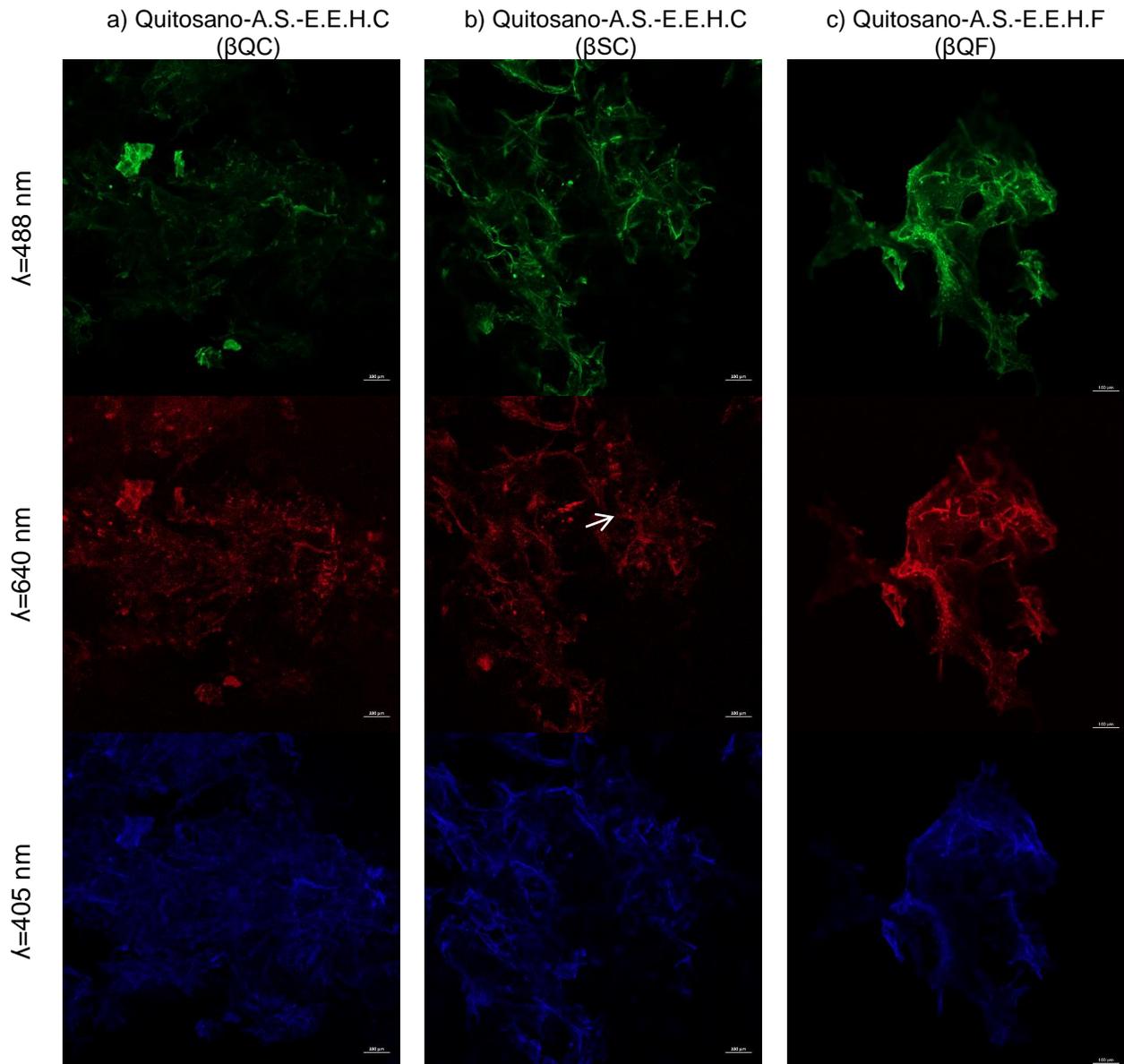


Figura 37. Micrografías de microscopía confocal de barrido láser de los microencapsulados de a) Qitosano-A.S.-E.E.H.C (β QC) 0.05%:1.5%:1.8% b) Qitosano-A.S.-E.E.H.C (β SC) 0.05%:2.5%:1.8%, c) Qitosano-A.S.-E.E.H.F (β QF), 0.05%:1.5%:1.8%, mediante 3 canales espectrales: color azul con el láser a 405 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 400 – 500 nm; color verde con el láser a 488 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 480 – 617 nm; color rojo con el láser a 640 nm al 5 % de excitación en un intervalo de 650 – 700 nm, con una barra de escala de 100 μ m

8. Conclusiones

El presente proyecto de investigación, permitió la identificación de compuestos presentes en el extracto etanólico de huitlacoche cocido (H.C.) y el extracto etanólico de huitlacoche fresco (H.F.) de tipo ácidos grasos, ácidos cinámicos, ácidos fenólicos, terpenos y la elucidación del 6-metoxi-2-benzoxazolinona (H.C. 10 mg, H.F. 17 mg), y del ácido 4-hidroxibenzoico 56 (H.C. 2 mg, H.F. 4.5 mg).

Además de la cuantificación de compuestos de interés como los polifenoles (H.F. 10.18 (mgEqA.G.)/g y H.C. 08.38 (mgEqA.G.)/g). donde el extracto de huitlacoche fresco es el que presenta mayor abundancia de metabolitos respecto al huitlacoche tratado con calentamiento.

Por otro lado, se usaron 2 polisacáridos lineales (quitosano QTS, alginato de sodio A.S.) y la combinación de estos (quitosano-alginato de sodio QTS-A.S) como una matriz encapsulante para los extractos etanólicos de *U. maydis*.

Dando origen a una serie de vehículos transportadores con dimensiones que van desde la escala nano a micro (QTS-E.H.: 2.97 nm a 11.93 μ m, QTS-A.S.-E.H: 7 a 14 μ m, A.S.-E.H.: 2.98 μ m), sin embargo, la concentración de polímero más viable para cada uno es de 1.5% ALG, 0.05% QTS y 0.01%:2.0% QTS-A.S, ya que los encapsulados poseen una morfología esférica (A.S., QTS, QTS-A.S.) y un tamaño homogéneo, en A.S se conservó el núcleo libre; para el QTS permitió mayor formación de encapsulados.

De manera general, se propone que la formulación de la mezcla alginato-quitosano para la conservación de los bioactivos presentes, debido a su doble recubrimiento por parte de los polielectrolitos mencionados. Además de mejorar su biodisponibilidad al emplear materiales comestibles y no tóxicos para el encapsulamiento.

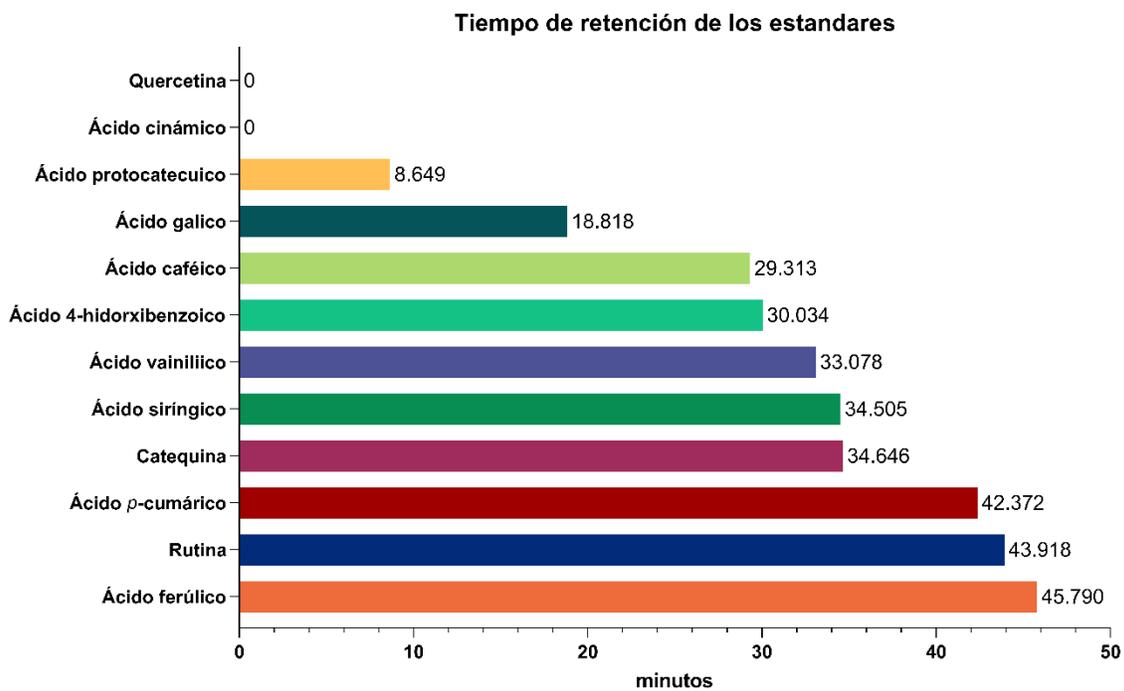
Con estos atributos, podemos concluir con base a la información obtenida en este proyecto los extractos etanólicos de *Ustilago maydis* (huitlacoche) se posicionan con potencial nutracéutico debido a su contenido micoquímico previamente mencionado, siendo principalmente ácidos grasos y polifenoles, además de que en el presente trabajo se proponen un vehículos encapsulantes (micro y nano), utilizados por primera vez para el huitlacoche, lo cual ayuda a proteger a los compuestos bioactivos y aislar el sabor de este hongo.

9.Perspectivas

- Estandarizar la metodología del encapsulamiento *Alginato de sodio + Extracto*
- Estandarizar la metodología del encapsulamiento *Quitosano + Extracto*
- Estandarizar la metodología del encapsulamiento *Alginato de sodio + Quitosano + Extracto*.
- Evaluar el perfil de liberación de las micro y nanocápsulas.

10. ANEXOS

10.1 Tiempos de Retención de los Estándares de Polifenoles

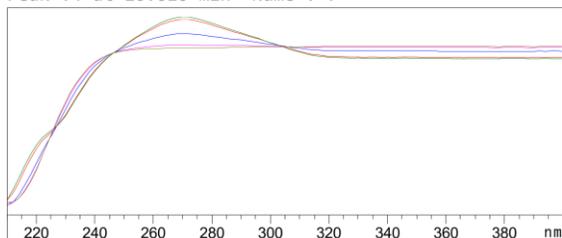


Gráfica 10. *Tiempo de retención de los estándares empleados para HPLC.*

10.2 Espectros de UV: Estándares

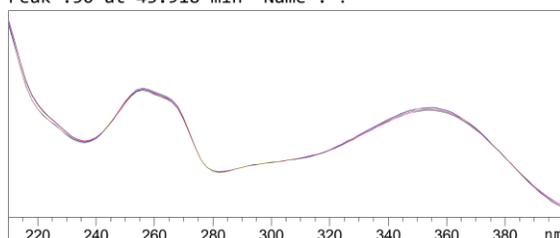
Ácido Gálico

Peak :4 at 18.818 min Name : ?



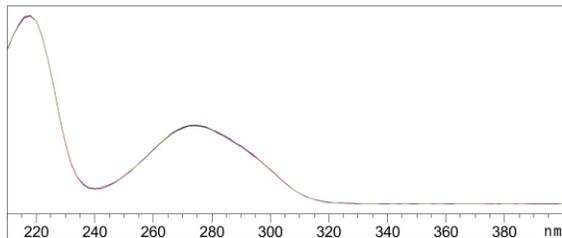
Rutina

Peak :50 at 43.918 min Name : ?



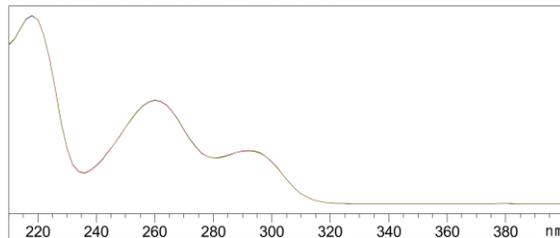
Ácido Sirínigico

Peak :7 at 34.505 min Name : ?



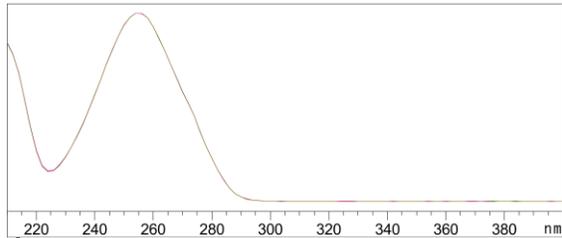
Ácido Vainílico

Peak :7 at 33.078 min Name : ?



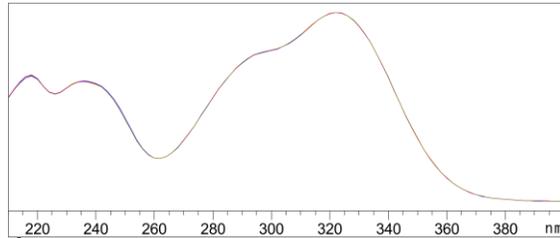
Ácido 4-hidroxibenzóico

Peak :14 at 30.034 min Name : ?



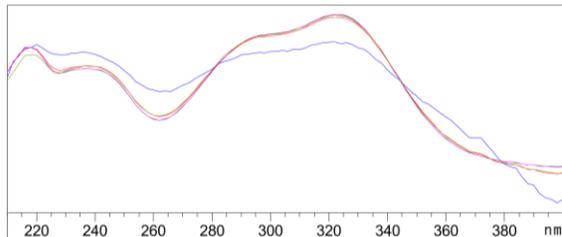
Ácido Ferúlico

Peak :10 at 45.790 min Name : ?



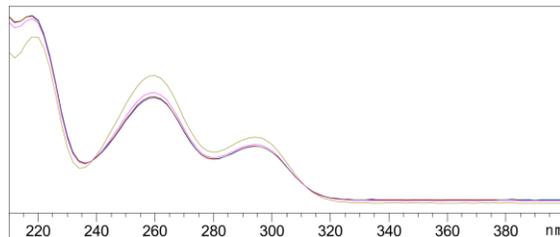
Ácido Cafeico

Peak :58 at 29.313 min Name : ?



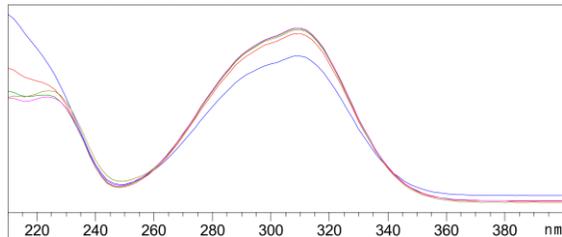
Ácido Protocateuico

Peak :32 at 8.649 min Name : ?



Ácido p-cumárico

Peak :10 at 42.372 min Name : ?



Espectro 12. UV-Vis de los estándares de polifenoles analizados por HPLC

10.3 CG-EM Reunión A01

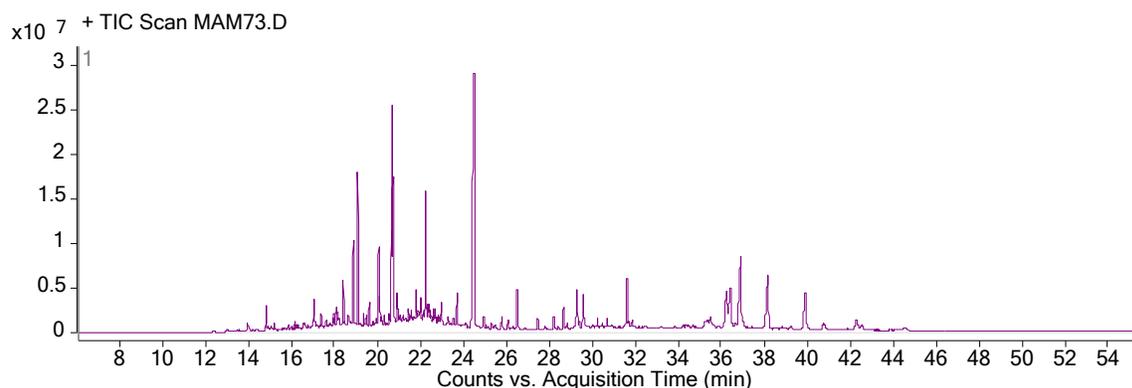


Figura 38. Cromatograma de gases de la reunión A01

Tabla 30. Compuestos presentes en la reunión A01

ACIDOS GRASOS							
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
01	Linoleato de etilo	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	97.66	308.3	67.1	20.674	6.24%
02	Oleato de etilo	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	97.66	310.3	55.1	20.714	3.63%
03	Palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	97.07	284.3	88.1	19.078	3.15%
19	1	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	94.22	294.3	67.1	20.044	1.75%
26	Palmitato de metilo	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	85.31	270.3	74.1	18.401	1.03%
ESTEROLES							
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
08	Espinasteronas	C ₂₉ H ₄₆ O	87.4	410.4	55.1	36.899	5.43%
09	Γ-sitostenona	C ₂₉ H ₄₈ O	90.82	412.4	124.1	38.16	3.86%
27	Lupeol	C ₃₀ H ₅₀ O	91.35	426.4	218.2	36.413	3.19%
28	Friedlein	C ₃₀ H ₅₀ O	95.49	426.4	69.1	39.894	2.97%
10	β-Ergostenona	C ₂₈ H ₄₆ O	86.38	398.4	124.1	36.242	2.50%

10.4 CG-EM Reunión A02

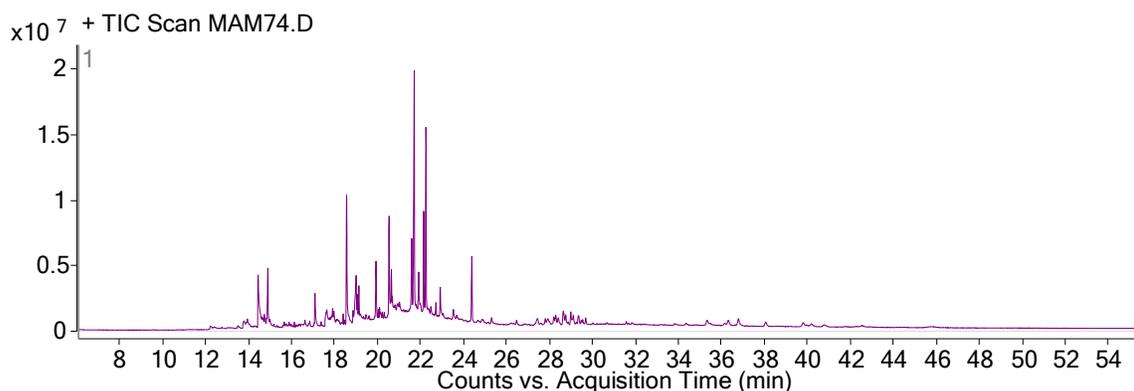


Figura 39. Cromatograma de gases de la reunión A02

Tabla 31. Compuestos presentes con porcentaje mayor a 1% en la reunión A02

ACIDOS GRASOS							
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
36	1	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	80.97	312.3	95.1	21.712	10.69%
37	2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	97.3	222.1	222.1	18.559	4.65%
04	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	85.39	282.3	55.1	21.587	4.53%
01	Linolenato de etilo	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	82.34	306.3	55.1	22.145	3.82%
38	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	86.28	282.3	55.1	21.916	3.73%
05	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	93.08	256.2	73.1	19.006	2.85%
39	3	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	83.41	268.2	57.1	19.925	2.21%
40	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	89.06	282.3	55.1	20.641	1.97%
41	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	87.8	282.3	55.1	20.943	1.65%
42	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	88.76	282.3	55.1	21.022	1.61%
43	2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	93.1	222.1	222.1	17.088	1.46%
44	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	92.18	282.3	55.1	20.687	1.19%
45	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	88.35	282.3	55.1	22.356	1.18%
OTROS							
46	-Desconocido-				101.1	22.251	6.72%
47	Etilo parabeno	C ₉ H ₁₀ O ₃	97.68	166.1	121.1	14.44	3.96%
48	Ftalato de bis(2-etilhexilo)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	95.62	390.3	149	24.385	2.39%
49	4	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	81.66	298.3	57.1	22.921	1.90%
20	Coixol	C ₈ H ₇ NO ₃	80.8	165	165.1	17.633	1.46%
50	5	C ₁₈ H ₂₄ O	88.02	256.2	57.1	19.13	1.06%

¹Ácido oxiraneundecanoico, 3-pentil-, éster metílico, trans-

²(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoato de etilo

³Acetato de 7-metil-Z-tetradecen-1-ol

⁴Ácido oxiraneoctanoico, 3-octilo-, cis-

⁵Estra-1,3,5(10)-trien-17.beta.-ol

10.5 CG-EM Reunión Q01

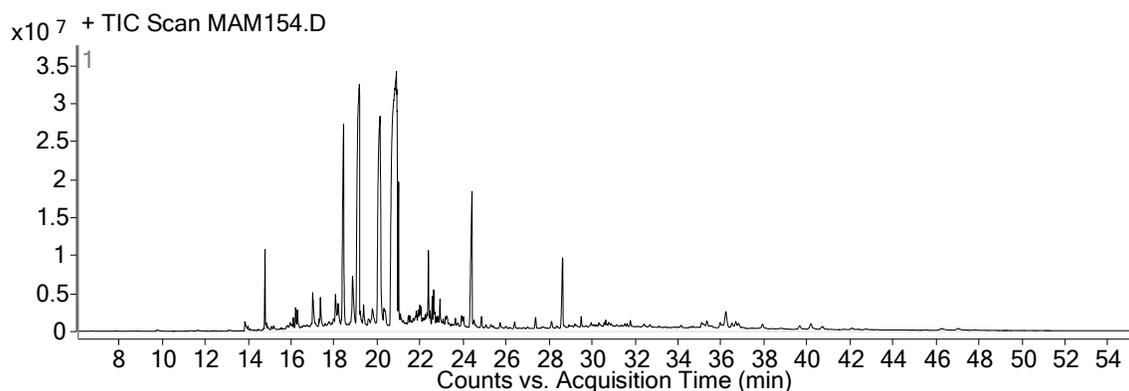


Figura 40. Cromatograma de gases de la reunión Q1

Tabla 32. Compuestos presentes con porcentaje mayor a 1% en la reunión Q01

ACIDOS GRASOS							
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
01	linoleato de etilo	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	95.49	308.3	67.2	20.897	34.24%
03	palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	96.53	284.3	88.2	19.176	15.33%
95	linoleato de metilo	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	95.61	294.3	67.2	20.135	14.97%
26	palmitato de metilo	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	96.76	270.3	74.2	18.434	7.09%
13	estearato de etilo	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	96.76	312.3	88.1	20.996	2.36%
11	escualeno	C ₃₀ H ₅₀	95.3	410.4	69.2	28.629	2.14%
06	(E)-9-palmitoleato de etilo	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	89.57	282.3	149.1	18.854	2.12%
96	ácido paulínico	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	85.82	310.3	55.2	22.388	1.54%
97	ceteno	C ₁₆ H ₃₂	98.59	224.2	55.2	14.782	1.25%
98	cetilmercaptano	C ₁₆ H ₃₄ S	87.19	258.2	43.2	17.002	1.23%
99	estearato de metilo	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	90.3	298.3	74.1	20.319	1.00%

10.6 CG-EM Reunión A-R05

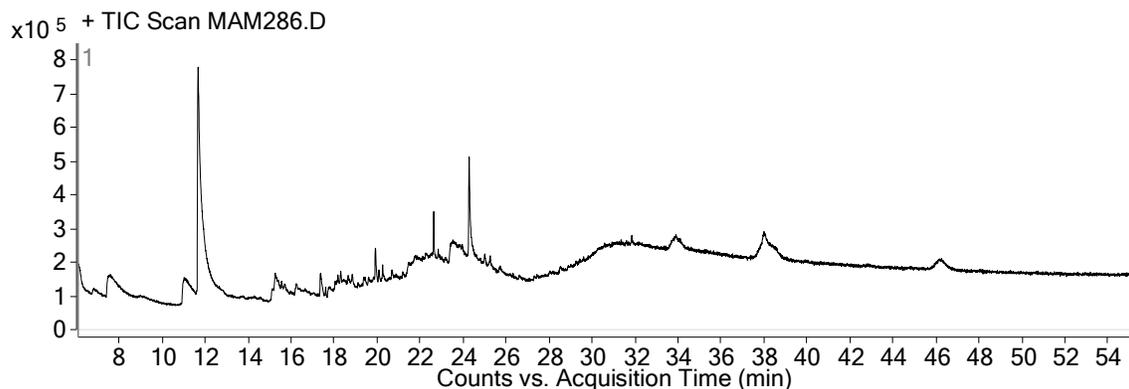


Figura 41. Cromatograma de gases de la reunión A-R05

Tabla 33. Compuestos presentes en la reunión A -R05

Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
54	2-metoxi-4-vinilfenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	90.88	150.1	150.1	11.668	41.16%
OTROS							
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
69	-Desconocido-	-	-	-	28.1	37.995	11.37%
70	-Desconocido-	-	-	-	43.1	7.583	7.64%
71	-Desconocido-	-	-	-	120.1	11.018	7.56%
72	-Desconocido-	-	-	-	43.2	24.28	7.23%
73	-Desconocido-	-	-	-	28.1	46.265	4.44%
74	-Desconocido-	-	-	-	192.1	23.525	3.34%
75	-Desconocido-	-	-	-	28.1	33.903	2.32%
76	-Desconocido-	-	-	-	28.1	15.261	2.07%
77	-Desconocido-	-	-	-	28.1	17.37	1.76%
78	-Desconocido-	-	-	-	28.2	19.919	1.62%
79	-Desconocido-	-	-	-	129.1	22.631	1.41%
80	-Desconocido-	-	-	-	28.1	16.234	1.10%

10.7 CG-EM Reunión Q-V01

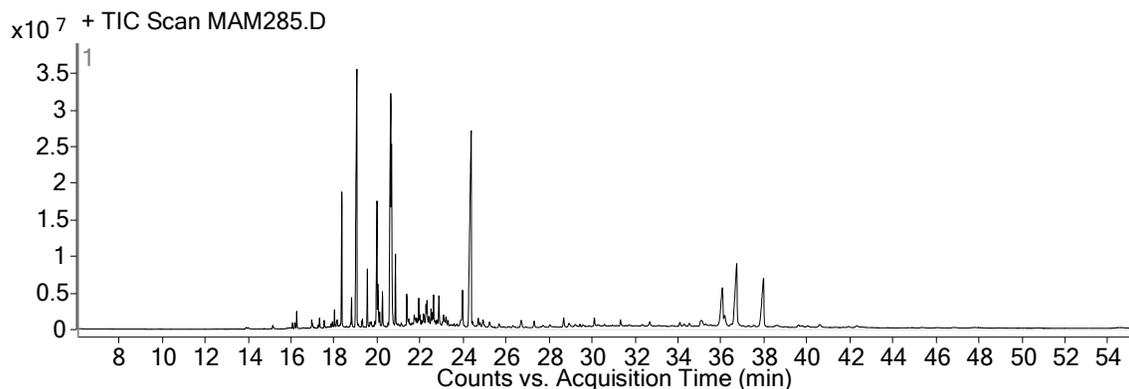


Figura 42. Cromatograma de gases de la reunión Q-V01

Tabla 34. Compuestos presentes en la reunión Q-V01

ÁCIDOS GRASOS							
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
01	Linoleato de etilo	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	97.74	308.3	67.2	20.635	12.72%
03	Palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	96.48	284.3	88.2	19.058	13.03%
02	Oleato de etilo	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	94.45	310.3	55.2	20.667	6.26%
95	Linoleato de metilo	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	93.68	294.3	67.2	19.991	4.62%
26	Palmitato de metilo	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	96.54	270.3	74.1	18.355	4.13%
100	elaidato de metilo	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	90.39	296.3	55.2	20.03	1.67%
13	Estearato de etilo	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	98.22	312.3	88.1	20.851	1.45%
99	Estearato de metilo	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	94.54	298.3	74.1	20.247	1.10%
101	-Desconocido-	-	-	-	129.1	22.631	1.41%
102	-Desconocido-	-	-	-	28.1	16.234	1.10%
ÁCIDOS GRASOS							
Cpo.	Cpo.	Cpo.	Cpo.	Cpo.	Cpo.	Cpo.	Cpo.
09	Gama-sitostenona	C ₂₉ H ₄₈ O	92.45	412.4	124.1	37.976	5.33%
08	Espinasterona	C ₂₉ H ₄₆ O	89.83	410.4	55.2	36.728	6.81%
10	4-campestene-3-uno	C ₂₈ H ₄₆ O	88.7	398.4	124.1	36.064	4.22%

10.8 CG-EM Reunión Q-S04

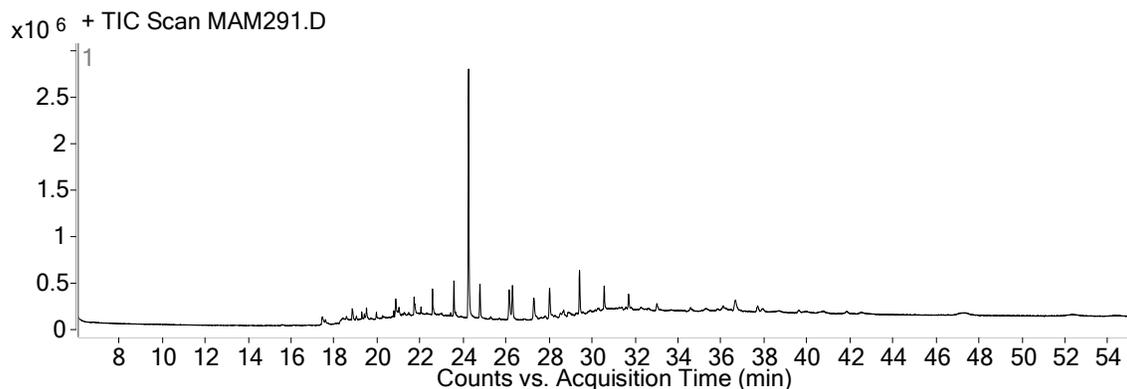


Figura 43. Cromatograma de gases de la reunión Q-S04

Tabla 35. Compuestos presentes en la reunión Q-S04

Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
89	Octocrileño	C ₂₄ H ₂₇ NO ₂	92.13	361.204	28.2	26.139	4.81%
30	heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	83.92	380.438	57.2	29.417	4.57%
90	heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	83.37	380.438	57.2	28.024	4.17%
93	heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	81.46	380.438	57.2	23.571	3.15%
OTROS							
Cpo.	Nombre	Fórmula	Score	Masa de referencia	Pico base	RT	%Área
88	1	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	97.48	390.277	149.1	24.252	25.66%
91		C ₂₄ H ₃₈ O ₄	82.92	390.277	28.2	27.289	3.83%
92	2	C ₂₇ H ₅₆	88.33	380.438	57.2	24.779	3.40%
41	3	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	80.95	268.24	57.2	22.579	2.17%
94	4	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	80.29	278.152	149.1	18.841	1.32%

Éster di(2-propilpentílico) del ácido ftálico

Éster bis(2-etilhexílico) del ácido 1,3-bencenodicarboxílico

Acetato de 7-metil-Z-tetradecen-1-ol

Éster butílico 2-metilpropílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico

10.9 Diagramas de Flujo Encapsulación

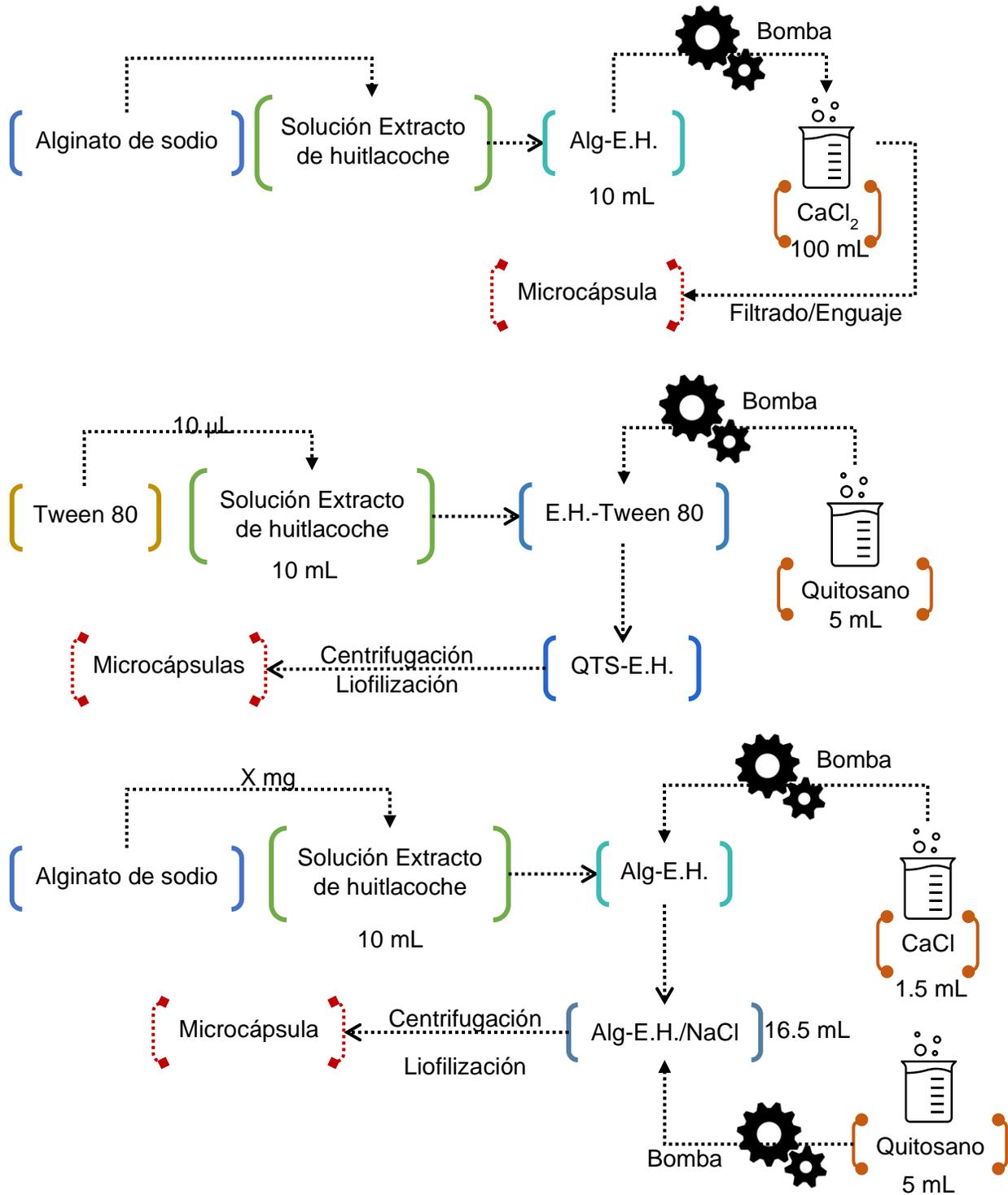
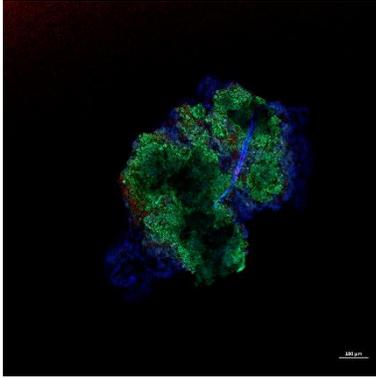


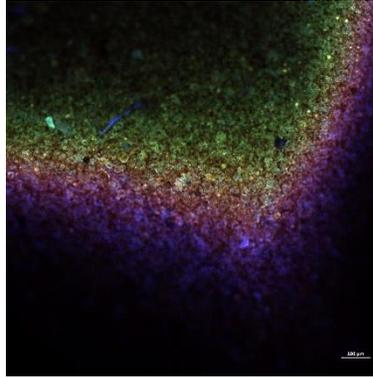
Diagrama 5. Diagramas de flujo de micro y nanoencapsulación

10.10 CLSM

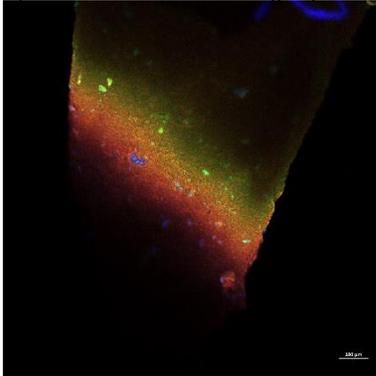
a) Quitosano-E.E.H.C (Λ C)



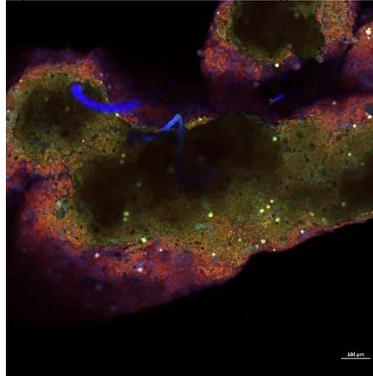
b) Quitosano-E.E.H.F. (Λ F)



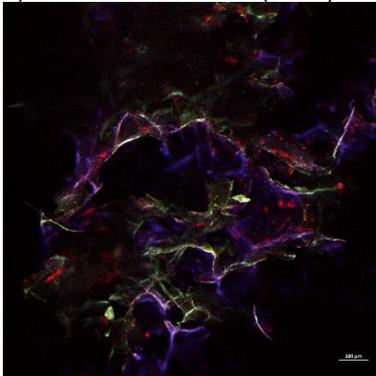
a) Quitosano-E.E.H.C (β C)



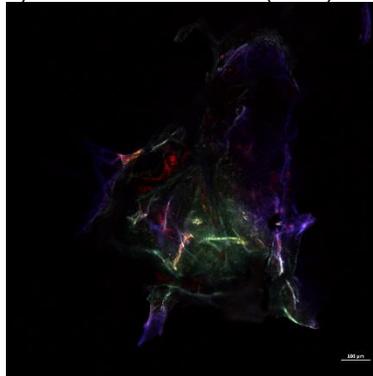
b) Quitosano-E.E.H.F. (β F)



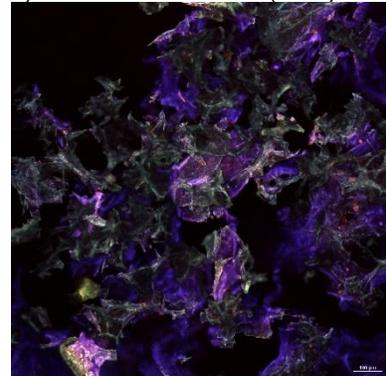
a) QTS-A.S.-E.E.H.C (Λ QC)



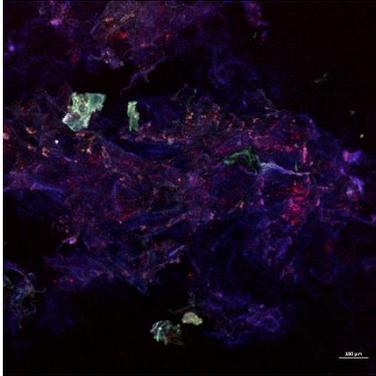
b) QTS-A.S.-E.E.H.C (Λ SC)



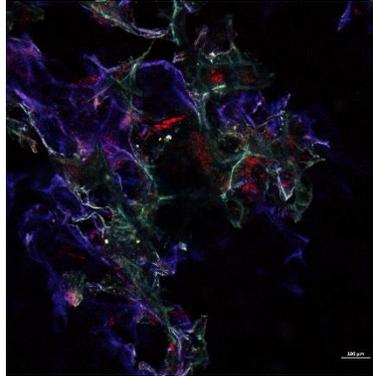
c) QTS-A.S.-E.E.H.C (Λ SF)



a) QTS-A.S.-E.E.H.C (β QC)



b) QTS-A.S.-E.E.H.C (β SC)



c) QTS-A.S.-E.E.H.F. (β QF)

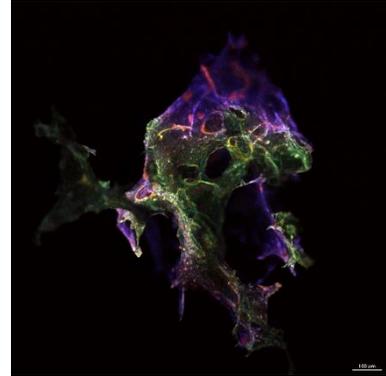


Figura 44. Sobreposicionamiento de micrografías de microscopía confocal de barrido láser a $\lambda = 405$ nm a 488 nm 640 nm

Referencias

- Abdul Khalil, K. (2020). A Review on Microencapsulation in Improving Probiotic Stability for Beverages Application. *Science Letters*, 14(1), 49. <https://doi.org/10.24191/sl.v14i1.7900>
- Abdur Rashid Mia, M., Uddin Ahmed, Q., Ferdosh, S., Bashar Mohammed Helaluddin, A., Najmul Hejaz Azmi, S., Ammar Al-Otaibi, F., Parveen, H., Mukhtar, S., Ahmed, M. Z., & Zaidul Islam Sarker, M. (2023). Anti-obesity and antihyperlipidemic effects of Phaleria macrocarpa fruit liquid CO2 extract: In vitro, in silico and in vivo approaches. *Journal of King Saud University - Science*, 35(8), 102865. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102865>
- Abtahi, S. A., Khoshkhoo, Z., Khorshidian, N., & Mohammadi, M. (2024). Alginate Microcapsules Loaded with Eryngium billardieri Extract and Its Application in Apple Juice. *Journal of Food Quality*, 2024(1), 12. <https://doi.org/10.1155/2024/6858230>
- Agnihotri, N., Mishra, R., Goda, C., & Arora, M. (2012). Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 02(01), 01–20. <https://doi.org/10.35652/igjps.2012.01>
- Akin-osanaiye, B. C., Adeyemi, G., & Alebiosu, R. A. (2011). Characterization and Antimicrobial Screening of Ethyl Oleat Isolated from Phyllanthus Amarus (Sehum and Thonn). *Annals of Biological Research*, 2(2), 298–305.
- Al-Obaidi, J. R., Jambari, N. N., & Ahmad-Kamil, E. I. (2021). Mycopharmaceuticals and nutraceuticals: Promising agents to improve human well-being and life quality. *Journal of Fungi*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/jof7070503>
- Alam, P., Imran, M., Ahmed, S., Majid, H., & Akhtar, A. (2023). Chitosan Nanoparticles for Enhanced Delivery of Sida cordifolia Extract: Formulation, Optimization and Bioactivity Assessment. *Pharmaceuticals*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/ph16111561>
- Alihosseini, F. (2016). Plant-based compounds for antimicrobial textiles. In *Antimicrobial Textiles*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100576-7.00010-9>
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- Arenas-Jal, M., Suñé-Negre, J. M., & García-Montoya, E. (2020). An overview of microencapsulation in the food industry: opportunities, challenges, and innovations. *European Food Research and Technology*, 246(7), 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03496-x>
- Asami, E., Kitami, M., Ida, T., Kobayashi, T., & Saeki, M. (2023). Anti-inflammatory activity of 2-methoxy-4-vinylphenol involves inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxidase synthase by

- heme oxygenase-1. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 45(5), 589–596.
<https://doi.org/10.1080/08923973.2023.2197141>
- Aydođdu, M., & Gölökcü, M. (2017). Nutritional value of huitlacoche, maize mushroom caused by *Ustilago maydis*. *Food Science and Technology*, 37(4), 531–535. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.19416>
- Barriuso, B., Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2012). Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chemistry*, 135(2), 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.027>
- Baysal, K., Aroguz, A. Z., Adiguzel, Z., & Baysal, B. M. (2013). Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59(May), 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073>
- Becker, J., Hosseinpour Tehrani, H., Gauert, M., Mampel, J., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2020). An *Ustilago maydis* chassis for itaconic acid production without by-products. *Microbial Biotechnology*, 13(2), 350–362. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13525>
- Boekhout, T., Fonseca, Á., Sampaio, J. P., Bandoni, R. J., Fell, J. W., & Kwon-Chung, K. J. (2011). Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Basidiomycetous Yeasts. *The Yeasts*, 3, 1339–1372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00100-2>
- Chandirika, J. U., Sindhu, R., Selvakumar, S., & Annadurai, G. (2018). Herbal Extract Encapsulated in Chitosan Nanoparticle: a Novel Strategy for the Treatment of Urolithiasis. *J. P. Sci*, 05(03), 1955–1961. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1212445>
- Chatterjee, D., Halder, D., & Das, S. (2021). Varieties of Mushrooms and their Nutraceutical Importance: A Systematic Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 1–6. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2021/47240.14660>
- Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N., & Kim, C. K. (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62493-y>
- Cui, E., Qian, S., Li, J., Jiang, X., Wang, H., Du, S., & Du, L. (2023). Discovery of Coixol Derivatives as Potent Anti-inflammatory Agents. *Journal of Natural Products*, 86(8), 1950–1959. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00309>
- da Silva Carvalho, A. G., da Costa Machado, M. T., de Freitas Queiroz Barros, H. D., Cazarin, C. B. B., Maróstica Junior, M. R., & Hubinger, M. D. (2019). Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis Martius*) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation. *Powder Technology*, 345, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.01.016>

- Dai, X., Chen, L., Liu, M., Liu, Y., Jiang, S., Xu, T., Wang, A., Yang, S., & Wei, W. (2022). Effect of 6-Methoxybenzoxazolinone on the Cecal Microbiota of Adult Male Brandt's Vole. *Frontiers in Microbiology*, *13*(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.847073>
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, *23*(7), 1361–1394. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>
- Dornburg, A., Townsend, J. P., & Wang, Z. (2017). Maximizing Power in Phylogenetics and Phylogenomics: A Perspective Illuminated by Fungal Big Data. In *Advances in Genetics* (1st ed., Vol. 100). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.007>
- El-Naggar, N. E. A., Shiha, A. M., Mahrous, H., & Mohammed, A. B. A. (2022). Green synthesis of chitosan nanoparticles, optimization, characterization and antibacterial efficacy against multi drug resistant biofilm-forming *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24303-5>
- Estrada, A. F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S., & Avalos, J. (2009). *Ustilago maydis* accumulates β -carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genetics and Biology*, *46*(10), 803–813. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.06.011>
- Feyissa, Z., Edossa, G. D., Gupta, N. K., & Negera, D. (2023). Development of double crosslinked sodium alginate/chitosan based hydrogels for controlled release of metronidazole and its antibacterial activity. *Heliyon*, *9*(9), e20144. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20144>
- Gaonkar, A., Vasisht, N., Khare, A., & Sobel, R. (2014). Microencapsulation in the Food Industry. In A. Gaonkar, N. Vasisht, A. Khare, & R. Sobel (Eds.), *Suparyanto dan Rosad (2015)* (1st ed., Vol. 5, Issue 3). Elsevier.
- Geiser, E., Przybilla, S. K., Friedrich, A., Buckel, W., Wierckx, N., Blank, L. M., & Bölker, M. (2016). *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate trans-aconitate. *Microbial Biotechnology*, *9*(1), 116–126. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12329>
- Guevarra, E. D., & Tabuchi, T. (1990). Accumulation of itaconic, 2-hydroxyparaconic, itatartaric, and malic acids by strains of the genus *ustilago*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54*(9), 2353–2358. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870333>
- Guzmán, G. (2008). Diversity and use of traditional mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *10*(3), 209–217. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i3.20>
- Haskins, R. H., & Thorn, J. A. (1951). Biochemistry of the Ustilaginales: Vii. Antibiotic Activity of Ustilagic Acid. *Canadian Journal of Botany*, *29*(6), 585–592. <https://doi.org/10.1139/b51-046>
- Hasnain, S., Nayak, A. K., Kurakula, M., & Hoda, M. N. (2020). Chapter 6. Alginate nanoparticles in drug

- delivery. In *Alginates in Drug Delivery*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817640-5.00006-6>
- Hosseini, S., & Varidi, M. (2021). Optimization of Microbial Rennet Encapsulation in Alginate – Chitosan Nanoparticles. *Food Chemistry*, 352(February 2020), 129325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129325>
- Hu, Y., Zhou, Q., Liu, T., & Liu, Z. (2020). Coixol suppresses NF- κ B, MAPK pathways and NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Molecules*, 25(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules25040894>
- Jafari, S. M. (2017). An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. In *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries* (pp. 1–34). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00001-X>
- Jeitler, M., Michalsen, A., Frings, D., Hübner, M., Fischer, M., Koppold-Liebscher, D. A., Murthy, V., & Kessler, C. S. (2020). Significance of Medicinal Mushrooms in Integrative Oncology: A Narrative Review. *Frontiers in Pharmacology*, 11(November). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580656>
- Jeong, J. B., Hong, S. C., Jeong, H. J., & Koo, J. S. (2011). Anti-inflammatory effect of 2-methoxy-4-vinylphenol via the suppression of NF- κ B and MAPK activation, and acetylation of histone H3. *Archives of Pharmacal Research*, 34(12), 2109–2116. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1214-9>
- Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001>
- Jurado, B., Aparcana, I., Villarreal, L., Ramos, E., Calixto, M., Hurtado, P., & Acosta, K. (2016). Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 82(3), 272–279.
- Kaliyaperumal, M., Kezo, K., & Gunaseelan, S. (2018). A Global Overview of Edible Mushrooms. In B. Pratap Singh, Lallawmsanga, & A. Kumar Passari (Eds.), *Biology of Macrofungi* (pp. 15–56). Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02622-6_2
- Kemp, C. J., D'Alessio, D. A., Scott, R. O., Kelm, G. R., Meller, S. T., Barrera, J. G., Seeley, R. J., Clegg, D. J., & Benoit, S. C. (2008). Voluntary consumption of ethyl oleate reduces food intake and body weight in rats. *Physiology & Behavior*, 93(4–5), 912–918. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.12.008>
- Klement, T., Milker, S., Jäger, G., Grande, P. M., Domínguez de María, P., & Büchs, J. (2012). Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-43>

- Kumar, P. (2018). Role of food and nutrition in cancer. In *The Role of Functional Food Security in Global Health* (pp. 193–203). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00012-8>
- Kurz, M., Eder, C., Isert, D., Li, Z., Paulus, E. F., Schiell, M., Toti, L., Vértesy, L., Wink, J., & Seibert, G. (2003). Ustilipids, acylated β -D-mannopyranosyl D-erythritols from *Ustilago maydis* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Antibiotics*, *56*(2), 91–101. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.91>
- Lee, H., & Lee, J. (2021). Anti-diabetic effect of hydroxybenzoic acid derivatives in free fatty acid-induced HepG2 cells via miR-1271/IRS1/PI3K/AKT/FOXO1 pathway. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(12), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13993>
- Łętocha, A., Miastkowska, M., & Sikora, E. (2022). Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers*, *14*(18). <https://doi.org/10.3390/polym14183834>
- Li, B., Elango, J., & Wu, W. (2020). Recent advancement of molecular structure and biomaterial function of chitosan from marine organisms for pharmaceutical and nutraceutical application. *Applied Sciences (Switzerland)*, *10*(14), 30–50. <https://doi.org/10.3390/app10144719>
- Lizárraga-Guerra, R., & G. Lopez, M. (1998). Monosaccharide and alditol contents of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, *11*(4), 333–339. <https://doi.org/10.1006/jfca.1998.0597>
- Lizárraga-Guerra, R., Guth, H., & López, M. G. (1997). Identification of the Most Potent Odorants in Huitlacoche (*Ustilago maydis*) and Austern Pilzen (*Pleurotus* sp.) by Aroma Extract Dilution Analysis and Static Head-Space Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(4), 1329–1332. <https://doi.org/10.1021/jf960650f>
- Lizárraga-Guerra, R., & López, M. G. (1996). Content of Free Amino Acids in Huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(9), 2556–2559. <https://doi.org/10.1021/jf960017u>
- López-Martínez, L. X., Aguirre-Delgado, A., Saenz-Hidalgo, H. K., Buenrostro-Figueroa, J. J., García, H. S., & Baeza-Jiménez, R. (2022). Bioactive ingredients of huitlacoche (*Ustilago maydis*), a potential food raw material. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, *4*. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100076>
- López, M. L., & Baeza, J. R. (2018). *Bioactividad de compuestos fenólicos de huitlacoche (Ustilago maydis)* L.X. López-Martínez 1 y R. Baeza-Jiménez 2. 3, 313–318.
- López, S., Manuel, J., Saldaña, M., Consolación, M., Camacho, R., Morales, C., María, R., Cardoso, S., Lorena, M., & Lara, G. (2017). Capacidad antioxidante y caracterización fitoquímica de extractos etanólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) crudo y cocido. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *48*(3), 37–47.

- Luo, Y., Wang, C. Z., Sawadogo, R., Yuan, J., Zeng, J., Xu, M., Tan, T., & Yuan, C. S. (2021). 4-Vinylguaiaicol, an Active Metabolite of Ferulic Acid by Enteric Microbiota and Probiotics, Possesses Significant Activities against Drug-Resistant Human Colorectal Cancer Cells. *ACS Omega*, *6*(7), 4551–4561. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04394>
- Maassen, N., Panakova, M., Wierckx, N., Geiser, E., Zimmermann, M., Bölker, M., Klinner, U., & Blank, L. M. (2014). Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Engineering in Life Sciences*, *14*(2), 129–134. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300043>
- Machado, A. R., Silva, P. M. P., Vicente, A. A., Souza-Soares, L. A., Pinheiro, A. C., & Cerqueira, M. A. (2022). Alginate Particles for Encapsulation of Phenolic Extract from *Spirulina* sp. LEB-18: Physicochemical Characterization and Assessment of In Vitro Gastrointestinal Behavior. *Polymers*, *14*(21). <https://doi.org/10.3390/polym14214759>
- Martau, G. A., Mihai, M., & Vodnar, D. C. (2019). The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector-biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. *Polymers*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/polym11111837>
- Martínez-Flores, A., Corrales-García, J. J., Espinosa-Solares, T., García-Gatica, P., & Villanueva-Verduzco, C. (2008). CAMBIOS POSTCOSECHA DEL HONGO COMESTIBLE HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (D.C.) Corda). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *XIV*(3), 339–346. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2007.09.043>
- Matuszewska, A., Jaszek, M., Stefaniuk, D., Ciszewski, T., & Matuszewski, Ł. (2018). Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197044>
- Meneses-Sagrero, S. E., Navarro-Navarro, M., Ruiz-Bustos, E., Del-Toro-Sánchez, C. L., Jiménez-Estrada, M., & Robles-Zepeda, R. E. (2017). Antiproliferative activity of spinasterol isolated of *Stegnosperma halimifolium* (Benth, 1844). *Saudi Pharmaceutical Journal*, *25*(8), 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.07.001>
- Moschona, A., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2018). Encapsulation of biological active phenolic compounds extracted from wine wastes in alginate-chitosan microbeads. *Journal of Microencapsulation*, *35*(3), 229–240. <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1462415>
- Muangrsri, R., Chuysinuan, P., Thanyacharoen, T., Techasakul, S., Sukhavattanukul, P., & Ummartyotin, S. (2022). Release Characteristic and Antioxidant Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid (4HB) from Sodium Alginate and Polyvinyl Alcohol-based Hydrogel. *ChemistrySelect*, *7*(34), 1–8. <https://doi.org/10.1002/slct.202202329>

- Myint, O., Wattanapongpitak, S., Supawat, B., Kothan, S., Udomtanakunchai, C., Tima, S., & Tungjai, M. (2021). Protein binding of 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid to human serum albumin and their anti-proliferation on doxorubicin-sensitive and doxorubicin-resistant leukemia cells. *Toxicology Reports*, 8, 1381–1388. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.07.001>
- Nath, A. H. (2018). Nutraceuticals: Innovative Research Area. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*, 4(6), 24–33. <https://doi.org/10.22623/ijapsa.2018.4024.g4wov>
- Nguyen, Q. N., Lee, S. R., Kim, B., Hong, J. H., Jang, Y. S., Lee, D. E., Pang, C., Kang, K. S., & Kim, K. H. (2022). Estrogenic Activity of 4-Hydroxy-Benzoic Acid from *Acer tegmentosum* via Estrogen Receptor α -Dependent Signaling Pathways. *Plants*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/plants11233387>
- Niculescu, A. G., & Grumezescu, A. M. (2022). Applications of Chitosan-Alginate-Based Nanoparticles—An Up-to-Date Review. *Nanomaterials*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/nano12020186>
- Oh, K. K., Adnan, M., & Cho, D. H. (2021). Elucidating drug-like compounds and potential mechanisms of corn silk (*Stigma maydis*) against obesity: A network pharmacology study. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(3), 1906–1936. <https://doi.org/10.3390/cimb43030133>
- Otaka, J., Subbarao, G. V., MingLi, J., Ono, H., & Yoshihashi, T. (2023). Isolation and characterization of the hydrophilic BNI compound, 6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone (MBOA), from maize roots. *Plant and Soil*, 489(1–2), 341–359. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06021-7>
- Panda, S. K., Sahoo, G., Swain, S. S., & Luyten, W. (2022). Anticancer Activities of Mushrooms: A Neglected Source for Drug Discovery. *Pharmaceuticals*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/ph15020176>
- Park, H. J. (2022). Current Uses of Mushrooms in Cancer Treatment and Their Anticancer Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810502>
- Park, S. Y., Seetharaman, R., Ko, M. J., Kim, D. Y., Kim, T. H., Yoon, M. K., Kwak, J. H., Lee, S. J., Bae, Y. S., & Choi, Y. W. (2014). Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells. *International Immunopharmacology*, 19(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.01.017>
- Pati, S., Crupi, P., Benucci, I., Antonacci, D., Di Luccia, A., & Esti, M. (2014). HPLC-DAD-MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite. *Food Research International*, 66, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.017>
- Patle, D., Khurana, N., Gupta, J., Kaur, P., & Khatik, G. L. (2023). Design, synthesis, and biological evaluation of coixol-based derivatives as potential antidiabetic agents. *Journal of Molecular Structure*, 1277, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134861>
- Phupaboon, S., Matra, M., Prommachart, R., Totakul, P., Supamong, C., & Wanapat, M. (2022). Extraction,

- Characterization, and Chitosan Microencapsulation of Bioactive Compounds from *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* L., and *Mitragyna speiosa* K. *Antioxidants*, *11*(11), 2103. <https://doi.org/10.3390/antiox11112103>
- Quinonez-Martinez, M., Ruan-Soto, F., Aguilar-Moreno, I. E., Garza-Ocañas, F., Lebgue-Keleng, T., Lavín-Murcio, P. A., & Enríquez-Anchondo, I. D. (2014). Knowledge and use of edible mushrooms in two municipalities of the Sierra Tarahumara, Chihuahua, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-67>
- Rahi, D. K., & Malik, D. (2016). Diversity of Mushrooms and Their Metabolites of Nutraceutical and Therapeutic Significance. *Journal of Mycology*, *2016*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/7654123>
- Rayar, A., & Manivannan, R. (2015). Evaluation of Antidiabetic Activity of Ethyl Linoleate Isolated from *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn Seed. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, *9*(2), 1–9. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2015/19222>
- Razgonova, M., Zinchenko, Y., Pikula, K., Tekutyeva, L., Son, O., Zakharenko, A., Kalenik, T., & Golokhvast, K. (2022). Spatial Distribution of Polyphenolic Compounds in Corn Grains (*Zea mays* L. var. Pioneer) Studied by Laser Confocal Microscopy and High-Resolution Mass Spectrometry. *Plants*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/plants11050630>
- Ripardo Filho, H. S., Pacheco, L. C., Souza Filho, A. P. S., Guilhon, G. M. S. P., Arruda, M. S. P., & Santos, L. S. (2012). Bioensaios de atividade alelopática dos esteroides espinasterol, espinasterona e glicopiranosil espinasterol. *Planta Daninha*, *30*(4), 705–712. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582012000400003>
- Rosalba Beas, F., Guadalupe Loarca, P., Salvador Horacio Guzmán, M., Rodriguez, M. G., Nora Lilia Vasco, M., & Fidel Guevara, L. (2011). Potencial nutraceutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona centro de México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, *42*(2), 36–44.
- Rubab, M., Chelliah, R., Saravanakumar, K., Barathikannan, K., Wei, S., Kim, J.-R., Yoo, D., Wang, M.-H., & Oh, D.-H. (2020). Bioactive Potential of 2-Methoxy-4-vinylphenol and Benzofuran from *Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra (Red Cabbage) on Oxidative and Microbiological Stability of Beef Meat. *Foods*, *9*(5), 568. <https://doi.org/10.3390/foods9050568>
- Saeed, N. M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H. M., Algandaby, M. M., Al-Abbasi, F. A., & Abdel-Naim, A. B. (2012). Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *264*(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.020>
- Safitri, A., Roosdiana, A., Kurnianingsih, N., Fatchiyah, F., Mayasari, E., & Rachmawati, R. (2022). Microencapsulation of *Ruellia tuberosa* L. Aqueous Root Extracts Using Chitosan-Sodium

Tripolyphosphate and Their In Vitro Biological Activities. *Scientifica*, 2022.

<https://doi.org/10.1155/2022/9522463>

- Salazar-Torres, J. C., Mendez-López, Alonso; Álvarez-Hernandez, R., & Sánchez-Vega, M. (2021). El Huitlacoche. Alimento prehispánico vigente en México. Historia, Aprovechamiento y Técnicas de Producción. In *Universidad Autónoma Chapingo-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro* (1ra ed.).
- Salazar López, J. M. (2013). "EFECTO DEL HUITLACOCHE (*Ustilago maydis-Zea mays*) SOBRE INDICADORES DE GLICEMIA Y LIPIDEMIA EN RATAS DIABÉTICAS." Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Santiago, F. H., Moreno, J. P., Cázares, B. X., Suárez, J. J. A., Trejo, E. O., de Oca, G. M. M., & Aguilar, I. D. (2016). Traditional knowledge and use of wild mushrooms by Mixtecs or Ñuu savi, the people of the rain, from Southeastern Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 1–22.
<https://doi.org/10.1186/s13002-016-0108-9>
- Sathiyabama, M., Boomija, R. V., Muthukumar, S., Gandhi, M., Salma, S., Prinsha, T. K., & Rengasamy, B. (2024). Green synthesis of chitosan nanoparticles using tea extract and its antimicrobial activity against economically important phytopathogens of rice. *Scientific Reports*, 14(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-58066-y>
- Seville, B., Donaldson, M., & Doyle, C. (2012). Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. In *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity* (Vol. 11, Issue tourism, p. 13). InTech. <https://doi.org/10.5772/30032>
- Shaffique, S., Kang, S. M., Kim, A. Y., Imran, M., Khan, M. A., & Lee, I. J. (2021). Current knowledge of medicinal mushrooms related to anti-oxidant properties. *Sustainability (Switzerland)*, 13(14), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/su13147948>
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65–77.
<https://doi.org/10.36948/ijfmr.2022.v04i06.1106>
- Szekalska, M., Sosnowska, K., Zakrzeska, A., Kasacka, I., Lewandowska, A., & Winnicka, K. (2017). The influence of chitosan cross-linking on the properties of alginate microparticles with metformin hydrochloride - In vitro and in vivo evaluation. *Molecules*, 22(1).
<https://doi.org/10.3390/molecules22010182>
- Taber, D. F. (1982). TLC Mesh Column Chromatography. *Journal of Organic Chemistry*, 47(7), 1351–1352.
<https://doi.org/10.1021/jo00346a039>
- Talamond, P., Verdeil, J. L., & Conéjéro, G. (2015). Secondary metabolite localization by autofluorescence in

- living plant cells. *Molecules*, 20(3), 5024–5037. <https://doi.org/10.3390/molecules20035024>
- Valadez Azúa, R., Fuentes Moreno, Á., & Gómez Álvarez, G. (2011). *Cuitlacocho: El Cuitlacocho*. Universidad Nacional Autónoma de México - Instituto de Investigaciones Antropológicas.
- Valdez-Morales, M., Barry, K., Fahey, G. C., Domínguez, J., de Mejía, E. G., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2010). Effect of maize genotype, developmental stage, and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacocho (*Ustilago maydis*). *Food Chemistry*, 119(2), 689–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.015>
- Valdez-Morales, M., Carlos, L. C., Valverde, M. E., Ramírez-Chávez, E., & Paredes-López, O. (2016). Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Lipid Profile of Huitlacocho Mushroom (*Ustilago maydis*) Produced in Several Maize Genotypes at Different Stages of Development. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 436–443. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0572-3>
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, 2015(Table 1), 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
- Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (1993). Production and Evaluation of Some Food Properties of Huitlacocho (*Ustilago Maydis*). *Food Biotechnology*, 7(3), 207–219. <https://doi.org/10.1080/08905439309549858>
- Vanegas, P. E., Valverde, M. E., Paredes-Lopez, O., & Pataky, J. K. (1995). Production of the edible fungus huitlacocho (*Ustilago maydis*): Effect of maize genotype on chemical composition. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(1), 104–106. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)98187-P](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)98187-P)
- Veza, T., Canet, F., de Marañón, A. M., Bañuls, C., Rocha, M., & Víctor, V. M. (2020). Phytosterols: Nutritional health players in the management of obesity and its related disorders. *Antioxidants*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9121266>
- Vimala Bharathi, S. K., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2018). Nano and Microencapsulation Using Food Grade Polymers. In *Polymers for Food Applications* (pp. 357–400). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94625-2_14
- Wang, D., Xiao, H., Lyu, X., Chen, H., & Wei, F. (2023). Lipid oxidation in food science and nutritional health: A comprehensive review. *Oil Crop Science*, 8(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2023.02.002>
- Wang, S. Q., Wang, X. N., Li, Y. Y., Di, X. X., & Lou, H. X. (2014). Identification of purine-derived compounds, ustilagomaydisin A-C, from the plant pathogen *Ustilago maydis* and their modulating effects on multidrug-resistant (MDR) tumors. *Phytochemistry Letters*, 10, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.09.006>

- Wathoni, N., Herdiana, Y., Suhandi, C., Mohammed, A. F. A., El-Rayyes, A., & Narsa, A. C. (2024). Chitosan/Alginate-Based Nanoparticles for Antibacterial Agents Delivery. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 19, Issue May, pp. 5021–5044). <https://doi.org/10.2147/IJN.S469572>
- Wilkerson, M. Y. (2022). Properties and applications of alginate. *Properties and Applications of Alginate*, 1–181. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94635>
- Wołtczańska, A. (2018). Mycosarcoma Maydis (Ustilago Maydis) – Benefits and Harmful Effects of the Phytopathogenic Fungus for Humans. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 4(1), 3746–3748. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.04.001005>
- Wongverawattanakul, C., Suklaew, P. on, Chusak, C., Adisakwattana, S., & Thilavech, T. (2022). Encapsulation of Mesona chinensis Benth Extract in Alginate Beads Enhances the Stability and Antioxidant Activity of Polyphenols under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Foods*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/foods11152378>
- Wu, H. C., His, H. Y., Hsiao, G., Yen, C. H., Leu, J. Y., Wu, C. C., Chang, S. H., Huang, S. J., & Lee, T. H. (2023). Chemical Constituents and Bioactive Principles from the Mexican Truffle and Fermented Products of the Derived Fungus Ustilago maydis MZ496986. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(2), 1122–1131. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08149>
- Xu, X., Luo, A., Lu, X., Liu, M., Wang, H., Song, H., Wei, C., Wang, Y., & Duan, X. (2021). p-Hydroxybenzoic acid alleviates inflammatory responses and intestinal mucosal damage in DSS-induced colitis by activating ER β signaling. *Journal of Functional Foods*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104835>
- Yu, G. R., Kim, J. E., Lim, D. W., & Park, W. H. (2023). The combination of Ephedrae herba and coixol from Coicis semen attenuate adiposity via glucocorticoid receptor regulation. *Scientific Reports*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47553-3>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020, 22 septiembre). *Huitlacoche delicioso y nutritivo*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/huitlacoche-delicioso-y-nutritivo>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022, julio). *Prevé agricultura alza en la producción de maíz, con 28.9 millones de toneladas al cierre del año agrícola 2022* [Comunicado de prensa]. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/preve-agricultura-alza-en-la-produccion-de-maiz-con-28-9-millones-de-toneladas-al-cierre-del-ciclo-agricola-2022?idiom=es>
- MNHN & OFB [Ed]. 2003-2022. Fiche de Ustilago maydis (DC.) Corda, 1842. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN). Site web : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/51310 - Le 3 novembre 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 07 de octubre del 2024

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS

PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: "Estudio químico y encapsulación de extractos del hongo ancestral huitlacoche *Ustilago maydis* como potencial nutracéutico", que presenta el L.D.M.N.Q. Carlos Axel Espíndola Gorostieta (10062676) para obtener el título de Maestro en Ciencias.

Dirección de tesis: Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

Codirección de tesis: Dra. América Ivette Barrera Molina

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO
Dr. Mario Alfonso Murillo Tovar CIQ-UAEM	APROBADO
Dra. Zormy Nacary Correa Pacheco CEPROBI-IPN	APROBADO
Dr. Daniel Tapia Maruri CEPROBI-IPN	APROBADO
Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez CIQ-UAEM	APROBADO



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 65
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 6011 / posgradoenciencias@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



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 MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2024-10-07 14:37:20 | FIRMANTE

ji8rvdwY7JjepkRK2AVqrr+3CKJVgqzYc9Nji7DvD9Vyuhukmnu7rkHpELxzD9LE6134Wvj8W5qts6+EVE3wL6VYdX9b82AhNyawcCyu2j3Hz38X5aiUIRDbvRTa0/3Yn5uSneWbsi+i4Z7is9jvQ7HKrDEKGBSMhrdvnvQ0RnD0q23Cioe70+tyfmC6lHIXpTS0c+F3YmceHWSHDEGkIOIC2fAIJP4gkOYWGrwaA7hcHrUuv542WzE3F89+sRlyBDov8wp51z9HJ0G05ovYjybkxGwK4cYTXxi5NuvYlfmzUZSLglDpMbWt6nvPPgzjtDchuMLrqkNS4zmHd48rhQ==

DANIEL TAPIA MARURI | Fecha:2024-10-07 14:59:29 | FIRMANTE

Pl/tm6UYhmA+oETUuc0ucUpyTts0wpJLhUuU6uVpp4iPS2+6GVEG/2KXs2OpgNeOHk9cOd3V4ZIIZ9g1cz9aNx2DMTNZsy+AHhdBgBx0NuQdab5zsAPmp7dFevfcre9+/XTcKTPBTqrHqM/9JSVd2wTaf9RfgWCgre07HyQ865X8VdMQGc55S56KFTczQ19whWvi6/yvZIZ9MkiREK9to6iA9bLtgSgA7iq48X+lftUaZXBUHb3qarRMAvczT6D64miokYACQUz+8Os5r0SGxlEHMWUcvt4Vdl5htBuVMQGu7hg9bkVUqTd/3XA9EM8mRr1/LtVvnsTaGKj5Hplqg==

MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR | Fecha:2024-10-07 15:22:10 | FIRMANTE

BBu0VHPnwpvmr+H5kqCm8FvW7d/Yz/SKQJc4D/CR3tH70G9GlpfbwayRiqmKOEUhzmQybt3WhGJe6cU5eGGibdEvX74IEuWJko28SVaYK+Eq2eLXoDglKHxal1NysLX6P4NAa4qhdSXf6nW0YNxE0c286C/YiHnf9TikMMVvmU+nvZy0YAAxQ81LiUk8D6EGJLlO9a+axqEC5EzoFTi6A9GbKkAfkxQ82716S1iSM4Tmg8G1gWC5neYJagE37hVWj5hxHUJ9hsiTgLb/4QL7vpTpY+6xli7Zwr037oV40E0D5URsQwBOg0qQ6YWFvI4KAam5OmDlcUP0N9cvLMWn+2Q==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2024-10-07 16:20:18 | FIRMANTE

yEJ7qhRDlR3e/SjC/V1XuKqR1aMtwlshj3aTrklk9f4awwAbMDc3X/gOhgiU9IKca/NsAo/brlrfFF2jN07IGzF+V60oSZmEZbzeT20o1/RJVX3YG2tW/x5uAdH2zeTnQXLh1gWwRyINTuhNnwYSiptUtU6Pa/V0KdEXj51WUW5T0FmAP4APCG52Z2Rlwb31+BY0YoGQLc+Xh5hc3OIxlr6BkopfvCF+WnlSBQ38phH11MLNF+9SLGpHMC4hRMDLPCTUKBPK6mM7a+dpUkADCvB4Qwa5MPjVIOBgCiLUreEkz3wkMylZxtZaayQs0jQB9xkSCucHIBLpUnJfLQ==

ZORMY NACARY CORREA PACHECO | Fecha:2024-10-15 07:20:37 | FIRMANTE

ByZj7WU4g2seuryBM2YVqWJZR4r5I0HHDIdCv5vJrl5nJe3jct4I2aFKIKf6VTlyfOsb0+BF+gEKSlmUihBPb9zqlkQThBlr3Tpu3TzjjYrjhJhQjNspN2khPLqYCFi6GOKigUDy1wS6vY5roIR9dLuYfFngcvXCN7kzWCpR9xyHv0MvvMZloTXZczXeJ8CDL6QbiYQqVXubZ/WiDm5i6AIA5eCzvSwjy5x1kbGktKBoi9vZTgxOQan8UBwgFq4KBS978pmsgSvW81J3x334ZT7J1wAx8aC048pW11BvOLMrQ682X7o3tWjhJhHH/OzDhr59pH99vZiKcXaLvGhzy==

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



U159ImRfK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cXFCQOkNoUvbc6uRVqqA8e6gImZadck>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029