

**Cuantificación de los compuestos bioactivos y
capacidad antioxidante del hongo *Cordyceps
sinensis* para su uso potencial como aditivo
alimentario**

Sergio Daniel Carrillo Alvarado

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Cuantificación de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante del hongo *Cordyceps sinensis* para su uso potencial como aditivo alimentario

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Sergio Daniel Carrillo Alvarado

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Cuantificación de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante del hongo *Cordyceps sinensis* para su uso potencial como aditivo alimentario

Sergio Daniel Carrillo Alvarado

Resumen. El uso de antioxidantes contribuye a disminuir el deterioro de los alimentos. Una práctica común en la actualidad es el uso de aditivos alimentarios de origen sintético, como el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA). El hongo *Cordyceps sinensis* es ampliamente usado en la medicina asiática y se ha encontrado que aporta múltiples beneficios. Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de este hongo como aditivo alimentario, se obtuvieron extractos a partir de harina de *C. sinensis*, utilizando extracto acuoso (T1), etanólico (T2), acuoso-etanólico (T3) y acuoso a 50 °C (T4) (en una relación soluto/solvente de 100 g/900 mL c/u). Para la harina se determinó la composición química proximal, obteniendo alto contenido de carbohidratos (80%), y valores bajos de humedad, proteína, grasa y cenizas (<10%). Se determinó el contenido de fitoquímicos, incluyendo contenido de polisacáridos totales (CPT), fenoles totales (CFT), flavonoides totales (CFvT), flavonas y flavonoles totales (CFFT), flavanonas y dihidroflavonoles totales (CFDT), y ácido clorogénico (CAC). Además, actividad antirradical DPPH y ABTS, así como poder reductor (PR). Los resultados indicaron que el extracto T3, seguido del extracto T1, presentaron la mayor capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y PR), lo cual fue asociado con el CFT, CFFT, y CFDT, así como CPT, CFvT y CAC, respectivamente. Se recomienda evaluar el efecto de la adición de los extractos obtenidos de la harina de *C. sinensis* sobre la estabilidad oxidativa y microbiológica de productos cárnicos.

Palabras clave: Actividad antirradical, agua, etanol, extractos, harina, solventes.

Abstract. The use of antioxidants contributes to reduce food spoilage. A common practice today is the use of food additives of synthetic origin, such as butyl hydroxytoluene (BHT) and butyl hydroxyanisole (BHA). The fungus *Cordyceps sinensis* is widely studied in Asian medicine and has been found to provide multiple benefits. In order to assess the antioxidant capacity potential of this product, extracts from *C. sinensis* flour, aqueous (T1), ethanolic (T2), aqueous-ethanolic (T3) and aqueous extracts were added at 50 °C (T4) (in a solute/solvent ratio of 900 mL / 100 g e/o). In the flour of the fungus the proximal chemical composition of the flour was determined, obtaining high carbohydrate content (80%), and low values of moisture, protein, fat and ashes (<10%). The phytochemical content, total polysaccharide content (CPT), total phenols (CFT), total flavonoids (CFvT), flavones and total flavonols (CFFT), flavanones and dihydroflavonols (CFDT), and acid were determined chlorogenic (CAC). In addition, the antirradical activity DPPH and ABTS, as well as reducing power (PR). The results indicated that the T3 extract, followed by the T1 extract presented the highest antioxidant capacity (DPPH, ABTS and PR), which was associated with CFT, CFFT and CFDT, as well as CPT, CFvT and CAC, respectively. It is recommended to evaluate the effect of the addition of extracts obtained from *C. sinensis* on the oxidative and microbiological stability of meat products.

Key Words: Anti-radical activity, water, ethanol, extracts, flour, solvents.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4. CONCLUSIONES.....	25
5. RECOMENDACIONES	26
6. LITERATURA CITADA.....	27
7. ANEXOS.....	33

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de los tratamientos en los cuatro solventes utilizados para obtener los extractos de <i>C. sinensis</i> , en una relación p/v 1:10.	4
2. Cuadro comparativo entre los resultados obtenidos del análisis químico proximal de la harina del hongo <i>C. sinensis</i> vs. el reportado por otros autores.	9
3. Actividad antirradical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (%) de los extractos de <i>C. sinensis</i> a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 62.5 µg/mL).	21

Figuras	Página
1. Marca comercial de la harina del hongo comestible (<i>Cordyceps sinensis</i>) comercializado por Aloha Medicinals Natural Products.	3
2. Rendimiento másico de los extractos de <i>Cordyceps sinensis</i> usando diferentes solventes.	11
3. Contenido de Polisacáridos Totales (CPT) en cuatro extractos de <i>Cordyceps sinensis</i> usando diferentes solventes, expresados como mg equivalente de glucosa/g (mg EG/g).	12
4. Contenido de Fenoles Totales (CFT) en cuatro extractos de <i>Cordyceps sinensis</i> usando diferentes solventes expresado como mg equivalente de ácido gálico/g (mg EAG/g).	14
5. Estructura básica del esqueleto de flavonoides. Fuente: Cartaya y Reynaldo, 2001.	15
6. Estructura de los principales flavonoides. Fuente: Sotero et al. 2011.	15
7. Contenido de Flavonoides Totales (CFvT) en cuatro extractos de <i>Cordyceps sinensis</i> usando diferentes solventes, expresados como mg equivalentes de rutina/g (mg ER/g).	16
8. Contenido de Flavonas y Flavonoles Totales (CFFT) en cuatro extractos de <i>Cordyceps sinensis</i> usando diferentes solventes. Los resultados son expresados como miligramos equivalentes de Quercetina/g (mg EQ/g).	18
9. CFDT, contenido de flavanonas y dihidroflavonoles totales. Los resultados son expresados como mg equivalentes de Hesperidina/g (mg EH/g).	19
10. Contenido de ácido clorogénico (CAC) en cuatro extractos de <i>Cordyceps sinensis</i> usando diferentes solventes. Los resultados son expresados como mg equivalentes de ácido clorogénico (mg EAC/g).	20

11.	Actividad antirradical 2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS. Los resultados son presentados como porcentaje de inhibición de radicales ABTS a diferentes concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos descritos a continuación.	22
12.	poder reductor por inhibición de los radicales libres de los extractos de <i>Cordyceps sinensis</i> a diferentes concentraciones.	23
13.	Análisis multivariado de la relación de los componentes principales (solvente utilizado en cada extracto y su relación con los compuestos bioactivos encontrados en estos, así como su actividad antioxidante (ABTS, DPPH, Poder reductor).	24
Anexos		Página
1.	Diagrama de proceso de obtención de extractos de la harina de <i>C. sinensis</i> .	33
2.	Curva de calibración para la cuantificación del contenido de carbohidratos totales.	33
3.	Curva de calibración para la cuantificación del contenido de fenoles totales.	34
4.	Curva de calibración para la cuantificación del contenido de flavonoides totales.	34
5.	Curva de calibración para la cuantificación del contenido de flavonas y flavonoles totales.	35
6.	Curva de calibración para la cuantificación del contenido de flavanonas y dihidroflavonoles totales.	35
7.	Curva de calibración para la cuantificación del contenido de ácido clorogénico total.	36
8.	Principales ácidos fenólicos presentes en la naturaleza.	36

1. INTRODUCCIÓN

La oxidación de lípidos (LOX) y proteínas es uno de los principales factores que afectan la calidad de la carne y los productos cárnicos, ya que esta tiene influencia sobre los atributos organolépticos tales como el color, sabor, textura y valor nutricional (Falowo *et al.* 2014). Los radicales libres suelen ser los iniciadores de LOX, por lo que la industria de los alimentos demanda el uso de antioxidantes que ayuden a inhibir la formación de estos iniciadores, así como disminuir la concentración de catalizadores de radicales libres como el oxígeno y los iones metálicos, Por ejemplo, si el peróxido de hidrógeno reacciona con un hierro catalizador como Fe^{+2} , la reacción de Fenton puede tomar lugar ($Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH + OH$) formando el radical hidroxilo HO (Carocho y Ferreira, 2013). Los antioxidantes pueden ser clasificados como sintéticos o naturales, en el primer grupo se encuentran compuestos como el butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP), entre otros. Sin embargo, su uso está controlado por normativas internacionales como el Codex Alimentarius (2018), tanto para los naturales como para los sintéticos, y debido al uso incontrolado de los aditivos, principalmente los sintéticos, debido al efecto adverso que pudieran tener sobre la salud del consumidor (Williams *et al.* 1999; Lobo *et al.* 2010); Carocho y Ferreira, 2013).

Por lo anterior, existe una creciente búsqueda de fuentes naturales, no tóxicas y funcionales, como alternativa a los antioxidantes sintéticos utilizados en la industria cárnica (Falowo *et al.* 2014). En diversos trabajos de investigación, se ha reportado que las plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes (Falowo *et al.* 2014; Shan *et al.* 2014). Los hongos comestibles han sido catalogados como fuente importante de estos fitoquímicos (Soares *et al.* 2009; Yildiz *et al.* 2015). Con relación a los hongos, *Cordyceps sinensis* (*Cephalosporium sinensis*) es un hongo endoparásito que se caracteriza por poseer una variedad importante de propiedades farmacológicas que son benéficas para la salud humana, las cuales han sido atribuidas a sus componentes. Por esta razón, ha sido usado durante siglos en la medicina tradicional China como una fuente importante de antioxidantes, como viagra natural, para incrementar el sistema inmunológico, para tratar enfermedades crónicas como el VIH, así como el tratamiento de enfermedades asociadas con el sistema respiratorio, renal, nervioso y cardiaco (Chen *et al.* 2013; Mamta *et al.* 2015).

Existen estudios en los que se ha reportado que *C. sinensis* contiene compuestos tales como la epipoliiodioxopiperazinas, llamadas gliocladicilinas A y B, capaces de inhibir el crecimiento de ciertas células tumorales (como of HeLa, HepG2 y MCF-7). También se han encontrado constituyentes de cordisinina (A – E), los cuales han sido relacionados con propiedades antiinflamatorias (Chen *et al.* 2013). Además, con relación a la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir del cultivo de cuerpos fructíferos de

C.sinensis, se ha reportado que esta es alta y que también posee un efecto en la peroxidación de lípidos, debido a que estos extractos inhiben la acumulación del éster de colesterol en macrófagos vía supresión de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad-LDL (Yamaguchi *et al.* 2000). Por lo anterior, existe un gran interés en la industria farmacéutica y alimentaria por el desarrollo de antioxidantes naturales obtenidos a partir de fuentes botánicas, siendo una de las posibles, los derivados de la medicina herbolaria tradicional China (Soares *et al.* 2009; Yildiz *et al.* 2015).

La actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de harina de hongos silvestres comestibles (por ejemplo, *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantherellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lacterius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*) ha sido reportada previamente y atribuida a la presencia de polisacáridos, flavonoides y ácidos fenólicos (Dubois *et al.* 1956; Palacios *et al.* 2011; Vargas-Sánchez *et al.* 2018). Estos compuestos se caracterizan por actuar como secuestradores de radicales libres y quelantes de iones metálicos, por lo que se han desarrollado diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante de alimentos y muestras biológicas (Ainsworth y Gillespie, 2007; Floegel *et al.* 2011).

Resulta importante el estudio de antioxidantes de origen natural que garanticen una mayor conservación de alimentos perecederos, como es el caso de la carne, disminuyendo el uso de los de origen sintético. En este estudio se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la composición química proximal de la harina de *Cordyceps sinensis*.
- Medir el rendimiento de extracción mediante la utilización de cuatro sistemas de solventes (agua, etanol, etanol-agua, y agua a 50 °C) para la obtención de extractos de harina de *Cordyceps sinensis*.
- Cuantificar el contenido de compuestos bioactivos (polisacáridos, compuestos fenólicos, flavonoides, flavonas y flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles y ácido clorogénico) presentes en los extractos de la harina de *Cordyceps sinensis*.
- Evaluar la capacidad antioxidante [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS; 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH); poder reductor] de los extractos de harina del hongo *Cordyceps sinensis*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área donde se realizó la investigación.

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Carne y Productos Cárnicos (LICPC), adscrito a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. El CIAD es una entidad dedicada a la investigación, por lo que en el LICPC una de las líneas de estudio es evaluar la capacidad antioxidante de diferentes fuentes naturales como son el uso de hongos comestibles; los cuales basados en su actividad biológica (actividad antioxidante y antimicrobiana) pudieran ser utilizados como ingrediente para la dieta de animales y como aditivo en los alimentos.

Descripción de la materia prima.

La harina del hongo comestible *Cordyceps sinensis* utilizado en este estudio fue adquirido en una empresa comercial (Aloha Medicinals Natural Products, USA) (Figura 1) a través de la colaboración con la empresa Alta Tecnología Industrial para la Salud Animal, S.A. de C.V. (ATISA – Ciencia Médica Animal), la cual se encuentra ubicada en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México. Esta compañía tiene como uno de sus objetivos el desarrollo y/o diseño de productos destinados a incrementar la salud de diversas especies animales, tales como aves, cerdos, bovinos y razas pequeñas.

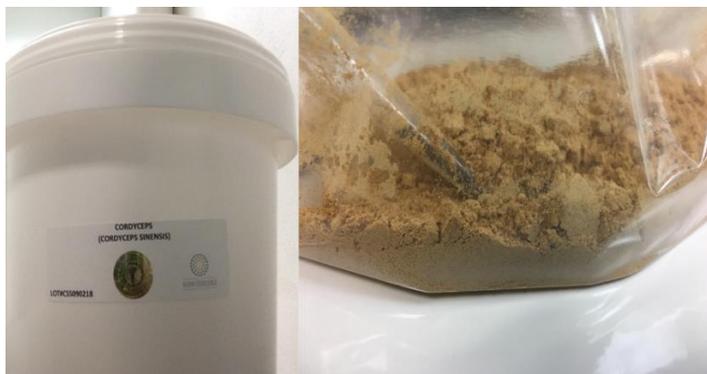


Figura 1. Marca comercial de la harina del hongo comestible (*Cordyceps sinensis*) comercializado por Aloha Medicinals Natural Products.

Diseño experimental.

Los análisis se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos del análisis químico proximal de la harina de *C.*

sinensis, se hizo con el programa estadístico National Social for the Social Studies NCSS, así como del contenido de fitoquímicos de los extractos obtenidos a partir de esta harina (cuadro 1), se llevó a cabo mediante análisis de varianza de una vía. Mientras que los datos obtenidos del análisis de capacidad antioxidante de los extractos componentes principales de los extractos (polisacáridos, fenoles, ácido clorogénico), se analizaron utilizando el software estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), entre los que se consideró el análisis de varianza de dos vías. Además, para conocer si existieron diferencias entre los tratamientos se realizó una prueba de comparación de medias por Tukey-Kramer al 95% de confianza. También se realizó un análisis multivariado (análisis de componentes principales) para determinar el nivel de asociación de todos los parámetros evaluados.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos en los cuatro solventes utilizados para obtener los extractos de *C. sinensis*, en una relación p/v 1:10.

Tratamiento	Solvente	Concentración v/v	Temperatura
T1	Agua	100	T _a
T2	EtOH 95%	100	T _a
T3	EtOH/H ₂ O	50/50	T _a
T4	Agua	100	50 °C

T_a = temperatura ambiente (25-30 °C).

Composición química proximal del hongo comestible.

La composición química proximal del hongo (contenido de humedad, grasa, proteína, cenizas y carbohidratos) se determinó de acuerdo con las técnicas descritas por la AOAC (1995). El contenido de humedad de las muestras se determinó por el método de secado en estufa (método AOAC 930.15); El contenido de proteína (N 4.38) de las muestras se estimó por el método de micro Kjeldahl. la grasa cruda se determinó por el método de Goldfish; el contenido de cenizas (materia inorgánica) se determinó por incineración a 550 ± 15 °C; y los carbohidratos (Extracto libre de nitrógeno, ELN) se calcularon por diferencia mediante la siguiente ecuación:

$$= 100 - (\% \text{humedad} - \% \text{proteína} - \% \text{grasa cruda} - \% \text{ceniza}) \quad [1]$$

Obtención del extracto.

Los fitoquímicos presentes en la harina del hongo (*Cordyceps sinensis*) se obtuvieron mediante el método de extracción asistida por ultrasonido (30 min, a temperatura ambiente 25 - 35 °C) utilizando un equipo de sonicación (Branson B5510, EUA); mientras que los solventes de extracción utilizados fueron agua, etanol, una mezcla 1:1 de ambos solventes, y agua a 50 °C (100 g/900 mL). A continuación, el solvente se filtró a vacío a través de papel filtro (Whatman 1), se concentró (rota-evaporador Yamato RE301-BW, Japón), y el residuo sólido o extracto obtenido se deshidrató al vacío (en un Liofilizador Yamato DC401, Japón), para enseguida calcular el rendimiento de extracción (%) y almacenarse a -20 °C bajo condiciones de oscuridad, hasta su análisis (Soares *et al.* 2009).

Contenido de polisacáridos totales.

La determinación del contenido de polisacáridos (CPT) de los extractos se realizó mediante el método fenol-ácido sulfúrico (DuBois *et al.* 1956), con modificaciones menores. Para lo cual, una alícuota de 250 μL de cada extracto (5 mg/mL) se mezcló (homogeneizador Analog Vortex, Fisher, EUA) con 25 μL de solución acuosa de fenol (5%, v/v) y 125 μL de ácido sulfúrico concentrado. Después, la mezcla de reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan Go, EUA), y la concentración de carbohidratos fue expresada en mg equivalentes de glucosa/g de extracto seco (mg EG/g).

Contenido de compuestos fenólicos.

Contenido de fenoles. El contenido de fenoles totales (CFT) de los extractos se determinó de acuerdo con el método descrito por Ainsworth y Gillespie (2007). Alícuotas de cada extracto (10 μL , 5 mg/mL) se homogenizaron con 40 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (0.25 N), 60 μL de Na_2CO_3 (7%, p/v) y 80 μL de agua destilada. Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente, en la oscuridad. La absorbancia se midió a 750 nm en un espectrofotómetro y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto (mg EAG/g).

Contenido de flavonoides. El contenido de flavonoides (CFvT) de los extractos se determinó de acuerdo con el método descrito por Zhishen *et al.* (1999), con modificaciones menores. Los extractos (25 μL , 5 mg/mL) se mezclaron con 500 μL de NaNO_2 (5%, p/v), 50 μL de AlCl_3 (10%, p/v) y 500 μL de NaOH (1 M). Posteriormente, la muestra se ajustó a 25 mL con etanol (70%, p/v) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, en la oscuridad. La absorbancia se midió a 510 nm en un espectrofotómetro y los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina/g de extracto (mg ER/g).

Contenido de flavonas y flavonoles. El contenido de flavonas y flavonoles totales (CFF) de los extractos se determinó en función de la formación de complejos de cloruro de aluminio (Popova *et al.* 2004), con modificaciones menores. Alícuotas del extracto (10 μL , 5 mg/mL) se homogenizaron con 130 μL de metanol y 10 μL de AlCl_3 (5%, p/v). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad. La absorbancia se midió a 412 nm en un espectrofotómetro, y los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina/g de extracto (mg EQc/g).

Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles. El contenido de flavanonas y dihidroflavonoles totales (CFD) de los extractos se determinó mediante el método descrito por Popova *et al.* (2004), con modificaciones menores. Previamente, 40 μL del extracto (5 mg/mL) se homogenizaron con 80 μL de solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) [50 mg DNP en 100 μL de ácido sulfúrico 96% (v/v), diluido a 10 mL con metanol] y se incubaron en un baño de agua a 50 °C, durante 50 min. Después de enfriar, la mezcla se diluyó con 280 μL de KOH (10%) en metanol (p/v), mientras que 30 μL de la solución resultante se diluyeron con 250 μL de metanol. La absorbancia se midió a 490 nm en un

espectrofotómetro y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de hesperidina/g de extracto (mg EH/g).

Contenido de ácido clorogénico. El contenido de ácido clorogénico (CAC) de los extractos se determinó por el método descrito por Griffiths *et al.* (1992), con modificaciones menores. Alícuotas del extracto (100 μ L, 5 mg/mL) se homogenizaron vigorosamente con 200 μ L de urea (0.17 M), 200 μ L de ácido acético glacial (0.1 M) y 500 μ L de agua destilada por 30 s. Posteriormente, a la mezcla se agregaron 500 μ L de NaNO₂ (0.14 M) y 500 μ L de NaOH homogenizándose durante 30 s, para después centrifugarse a 2,250 \times g durante 10 min. La absorbancia se midió a 510 nm en un espectrofotómetro y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido clorogénico/g de extracto (mg EAC/g).

Actividad antioxidante.

Actividad antirradical DPPH. La actividad antirradical DPPH• de los extractos se evaluó mediante el método descrito por Molyneux (2004), con modificaciones menores. Una serie de diluciones de cada extracto (100 μ L, a diferentes concentraciones) se homogenizaron con 100 μ L de solución de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo, 300 μ mol), e incubaron durante una hora a temperatura ambiente, en la oscuridad. Posteriormente, la absorbancia se midió a 517 nm en un espectrofotómetro y los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición: %DPPH• = [1 - (Abs M - Abs B / Abs B) x 100]; donde Abs M es la absorbancia de la mezcla de reacción después del periodo de incubación y Abs B es la absorbancia del blanco DPPH• a t = 0 min.

Actividad antirradical ABTS^{•+}. La actividad antirradical ABTS^{•+} de los extractos se evaluó por el método descrito por Re *et al.* (1999), con modificaciones menores. Una serie de diluciones de cada extracto (20 μ L, a diferentes concentraciones) se mezclaron con 180 μ L de solución ABTS^{•+} [2,2-azinobis- (3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] (Abs 0.7 – 0.8 a 730 nm, en buffer de fosfato pH 7.4). La absorbancia se midió a 730 nm en un espectrofotómetro, 6 min después de incubar en la oscuridad a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición. % ABTS^{•+} = (Abs M - Abs B / Abs B) x 100; donde Abs M es la absorbancia de la mezcla de reacción después del periodo de incubación y Abs B es la absorbancia del blanco ABTS^{•+} a t = 0 min.

Actividad reductora (azul prusiano). El poder reductor de los extractos se determinó por el método descrito por Oyaizu (1986), con modificaciones menores. Una serie de diluciones de cada extracto (200 μ L, a diferentes concentraciones) se homogenizaron con 500 μ L de buffer de fosfato (50 mM, pH 7.0) y 500 μ L de ferrocianuro de potasio (1%, p/v) e incubaron en un baño de agua a 50 °C por 20 min. Posteriormente, se añadieron 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA, 10% p/v) a los tubos con la mezcla de reacción, y se centrifugaron a 2,250 \times g por 10 min. Finalmente, se mezclaron 500 μ L del sobrenadante con agua destilada y 100 μ L de FeCl₃ (0.1%, p/v). La absorbancia se midió a 700 nm en un espectrofotómetro y los resultados fueron expresados en valores de absorbancia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la composición química proximal de la harina de *Cordyceps sinensis*.

Contenido de humedad. La determinación del contenido de humedad es reconocida como uno de los análisis más importantes en los alimentos; sin embargo, es considerado entre los más imprecisos, ya que el intercambio de humedad entre la matriz del alimento y el medio ambiente puede provocar una subestimación o una sobreestimación. El contenido de humedad en alimentos es muy variable, lo cual está asociado a factores como el estado físico y la ubicación del agua en la muestra, por lo que se han desarrollado diversos métodos oficiales con procedimientos establecidos para cada alimento o producto en particular (Mauer y Bradley 2017).

En el presente estudio, los resultados obtenidos mostraron un contenido de humedad de $3.81 \pm 0.1\%$ en la harina de *C. sinensis* (cuadro 2), cuyo valor es similar al reportado en la ficha técnica de la composición química proximal proporcionada por el proveedor (Aloha Medicinals Natural Products), el cual fue 3.97%. Al comparar los resultados obtenidos para este parámetro con otros estudios (Xiao *et al.* 2009; Sethy *et al.* 2016), se puede observar que el contenido de humedad está por debajo de los valores de referencia para *C. sinensis*, mientras que al comparar con otras especies de Cordypces (*C. gunnii* y *C. taii*), el contenido de humedad es mayor. No obstante, Li *et al.* (2006) reportaron valores mucho menores de humedad para *C. sinensis*.

Por otro lado, se ha reportado que el contenido de humedad es aproximadamente 90% para el cuerpo fructífero de hongos frescos, por lo que la materia seca puede representar menos del 10%. Este contenido de humedad puede variar dependiendo de las condiciones climáticas cambiantes, condiciones establecidas durante el cultivo (método de esporulación, temperatura, humedad y sustrato), método de colecta, procesamiento post-cosecha (liofilización o pulverización del cuerpo fructífero) u otros factores presentados durante el proceso de comercialización (condiciones de almacenamiento y transporte) (Hsu *et al.* 2001; Wang *et al.* 2014a).

Contenido de proteína. El contenido de proteína en alimentos varía ampliamente, siendo los alimentos de origen animal y las leguminosas las principales fuentes. Diversos métodos han sido desarrollados para medir este componente, cuyos principios están basados en la determinación de nitrógeno, enlaces peptídicos, aminoácidos aromáticos, capacidad de unión a un colorante en específico, capacidad de absorción de proteínas a la luz UV y propiedades de dispersión de la luz (Chang y Zhang 2017). El método Kjeldahl es uno de los más utilizados para la determinación de proteína en el etiquetado nutricional, basándose en términos del contenido de nitrógeno (N) total (Chang y Zhang 2017). Para el análisis se

utilizó un factor de conversión de 4.38, debido a que se suele usar este factor en muestras de hongos, a modo de corrección por metabolitos nitrogenados que pueda tener como los alcaloides. Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron un contenido de proteína de $6.67 \pm 0.1\%$ en la harina de *C. sinensis* (Cuadro 2). Al comparar los resultados obtenidos para este parámetro con otros estudios, se puede observar que el contenido de proteína es inferior a los valores de referencia para *C. sinensis*, debido a que se han reportado valores superiores al 10% para esta especie (Li *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2009; Sethy *et al.* 2016).

Contenido de grasa. Los alimentos contienen diferentes tipos de lípidos (mono, di, y triglicéridos, fosfolípidos, esteroides, ceras, ácidos grasos libres, entre otros) los cuales se caracterizan por ser solubles en solventes orgánicos de baja polaridad, entre los que se pueden mencionar al éter de petróleo (Ellefson 2017). Referente a la extracción de estos para su cuantificación, el método de extracción con solvente continua o método gravimétrico Goldfish es un método siempre de extracción de lípidos continúa, pero al representar un riesgo considerable de incendio, se está descontinuando su uso y este se basa en la extracción de la grasa por exposición de la muestra a un solvente en ebullición (Ellefson 2017).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron un contenido de grasa de $3.92 \pm 0.6\%$ en la harina de *C. sinensis* (Cuadro 2). Al comparar los resultados obtenidos para este parámetro con otros estudios, se puede observar que el contenido de grasa es mayor a lo valores de referencia para *C. sinensis* reportados por Sethy *et al.* (2016); sin embargo, es inferior a lo reportado en otros estudios en los que se determinó el contenido de grasa en otras especies de Cordyceps, ya que se han reportado valores superiores al 5% (Li *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2009). En otros trabajos de investigación, se ha reportado que el contenido total de grasa en hongos silvestres comúnmente es bajo, oscilando entre 1 y 6.7% para especies recolectadas en China (Wang *et al.* 2014a).

Contenido de ceniza. El contenido de ceniza representa el contenido de mineral total en los alimentos, y este se refiere al residuo inorgánico que queda después de la combustión del alimento (500 - 600 °C), previo a una pre-incineración, lo cual se realiza con la finalidad de preparar la muestra para evitar la pérdida de material que podría evaporarse durante la incineración en húmedo (Harris y Marshall 2017). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron un contenido de ceniza de $5.6 \pm 0.1\%$ en la harina de *C. sinensis* (Cuadro 2). Al comparar los resultados obtenidos para este parámetro con otro estudio, se puede observar que el contenido de ceniza es menor al valor de referencia para *C. sinensis* reportado por Sethy *et al.* (2016). El contenido de ceniza en hongos silvestres es variable, y este dependerá de la capacidad del hongo para acumular macro y microelementos que son esenciales para el crecimiento de este; siendo los elementos potasio (K) y fósforo (P) los predominantes, seguido por calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) y hierro (Fe) (Wang *et al.* 2014a).

Contenido de carbohidratos. Los carbohidratos son importantes en los alimentos debido a que son una valiosa fuente de energía, además de impartir propiedades texturales y fibra dietética que contribuyen a la salud general. Derivado de esto, existe un gran interés en el análisis de carbohidratos de diferentes ingredientes para dietas animales o para formulaciones alimenticias, debido a sus propiedades estructurales y efectos fisiológicos

(digestibilidad o funcionalidad –prebiótico-) (BeMiller 2017; Wang *et al.* 2014a). De acuerdo con las normas de etiquetado nutricional de la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos), el contenido total de carbohidratos de un alimento es calculado por diferencia de las sumas del contenido de humedad, proteína, grasa y ceniza. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este cálculo no es una medida exacta del contenido real de carbohidratos (BeMiller, 2017).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron un contenido de carbohidratos de 80.0 ± 0.5 % en la harina de *C. sinensis* (Cuadro 2). Al comparar estos resultados con los obtenidos en otros estudios, se puede observar que el contenido de carbohidratos es mayor a los valores de referencia para *C. sinensis* (Li *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2009; Sethy *et al.* 2016) y otras especies de Cordyceps (Xiao *et al.* 2009). El contenido de carbohidratos de hongos silvestres es variable y dependiente de la especie; este valor puede oscilar entre 13 y 65% en hongos silvestres colectados en China (Quian *et al.* 2016). Entre los carbohidratos digeribles de hongos silvestres se pueden encontrar manitol, glucosa y glicógeno, mientras que los no digeribles están conformados por oligosacáridos y polisacáridos que no contienen almidón, como la quitina, los β -glucanos y los mananos (Cheung 2010).

Cuadro 2. Cuadro comparativo entre los resultados obtenidos del análisis químico proximal de la harina del hongo *C. sinensis* vs. el reportado por otros autores.

Parámetro	Valor experimental	<i>C. gunnii</i> ¹	<i>C. taii</i> ¹	<i>C. sinensis</i> ¹	<i>C. sinensis</i> ²	<i>C. sinensis</i> ³
Humedad	3.8 ± 0.1	2.3	2.9	6.4	7.2	1.7
Proteína	6.7 ± 0.1	10.0	7.5	14.8	21.5	25.3
Grasa	3.9 ± 0.6	23.8	10.4	6.6	1.8	4.9
Ceniza	5.6 ± 0.1	*	*	*	7.5	*
Carbohidratos	80.0 ± 0.5	17.1	20.2	39.4	62.1	*

Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes (n = 6). * datos no determinados. ¹Xiao *et al.* 2009; ²Sethy *et al.* 2016; ³Li *et al.* 2006.

Extracción de fitoquímicos. Los estudios cualitativos y cuantitativos de compuestos bio-activos tales como alcaloides, antocianinas, saponinas, polifenoles, taninos y terpenoides, los cuales provienen de materiales vegetales (hojas, tallos, flores y frutos) se basan comúnmente en la selección de un método o la combinación de métodos adecuados para la extracción. Los factores más comunes que afectan o mejoran el proceso de extracción son las propiedades de la matriz del material vegetal, así como temperatura, presión, tiempo y solvente de extracción (Azmir *et al.* 2013).

En la última década, se han desarrollado un gran número de investigaciones destinadas a la obtención de fitoquímicos mediante la utilización de diferentes métodos de extracción, entre los cuales se encuentran métodos convencionales (extracción por maceración, Soxhlet e hidrodestilación) y métodos no convencionales (extracción asistida por ultrasonido,

enzimas, microondas, presurización líquida y fluido supercrítico) (Azmir *et al.* 2013; Asghari *et al.*; Cravotta G. *et al.* 2008; 2011 Barba *et al.* 2016).

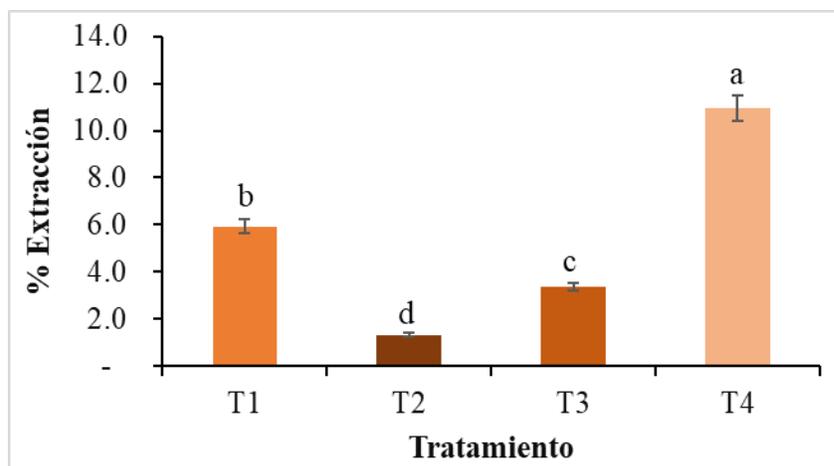
La optimización de los procesos de extracción ha dado como resultado un incremento de trabajos interesados por la búsqueda y obtención de compuestos bioactivos, con fines farmacéuticos o para ser utilizados como aditivos alimentarios (Falowo *et al.* 2014; Barba *et al.* 2016). Por ello, en este trabajo de investigación se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el rendimiento de extracción de fitoquímicos presentes en la harina de *C. sinensis* (Figura 2).

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para el rendimiento de extracción, el cual se presentó de acuerdo con el siguiente orden T4 (11%) > T1 (5.9%) > T3 (3.4%) > T2 (1.3%). Según Mamta *et al.* (2015), se reportan rendimientos de extracción de fitoquímicos en harina de *C. sinensis* en el siguiente orden: extracto acuoso-etanólico 1:1 (37.4%) > extracto acuoso (32.3%) > extracto etanólico (22.6%); sin embargo, estos extractos fueron obtenidos utilizando los mismos solventes, pero en combinación con un método de extracción no convencional (extracción acelerada de solventes ASE 350), por lo cual obtuvieron mayores rendimientos, en el orden de resultados, el extracto etanólico tuvo menor rendimiento debido a que este es volátil, por lo cual pudo haberse evaporado durante la extracción con rotavapor.

En la literatura es limitado el número de trabajos en los que se hayan evaluado cómo estos parámetros del solvente inciden sobre el rendimiento de extracción de compuestos bioactivos en *C. sinensis*, el efecto de la polaridad del agua y el etanol como disolventes y su capacidad de disolver solutos dipolares. El coeficiente de partición (es un parámetro que describe la manera como en una disolución, un soluto bioactivo se ubica predominantemente en el solvente que le sea más afín dentro de una mezcla de solventes, donde habrá otros solutos que serán más afines al otro solvente (Leo 1993).

La permitividad eléctrica también influye en este tipo de extracción por ultrasonido, ya que según la susceptibilidad eléctrica de las moléculas (fitoquímicos) se puede polarizar más y obtener más, o menos extracción de estos compuestos con los solventes utilizados. En estos materiales dieléctricos y dependiendo de la constante dieléctrica de las moléculas, se genera la polarización de las moléculas en los solventes cuando se somete al campo eléctrico exterior (sonicación).

El rendimiento másico de los extractos contiene los compuestos bioactivos concentrados para su cuantificación, estos pueden estar en diferentes concentraciones, siendo el objeto de este estudio la cuantificación a nivel macro de compuestos fenólicos, y dentro de los compuestos fenólicos, están los compuestos flavonoides, y dentro de los flavonoides, se tienen las flavonas y flavonoles y las flavanonas y dihidroflavonoles. Cada uno de estos se cuantifica espectrofotométricamente como mg equivalentes de un compuesto representativo de cada grupo, que se utilizan como control estándar en cada corrida espectrofotométrica, en multiceldas con cantidades de microlitros, en una combinación de reactivos en métodos oficiales establecidos, que ayudan a que por el cambio de color se cuantifique el tipo y cantidad de compuesto.



T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-d) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 2. Rendimiento másico de los extractos de *Cordyceps sinensis* usando diferentes solventes.

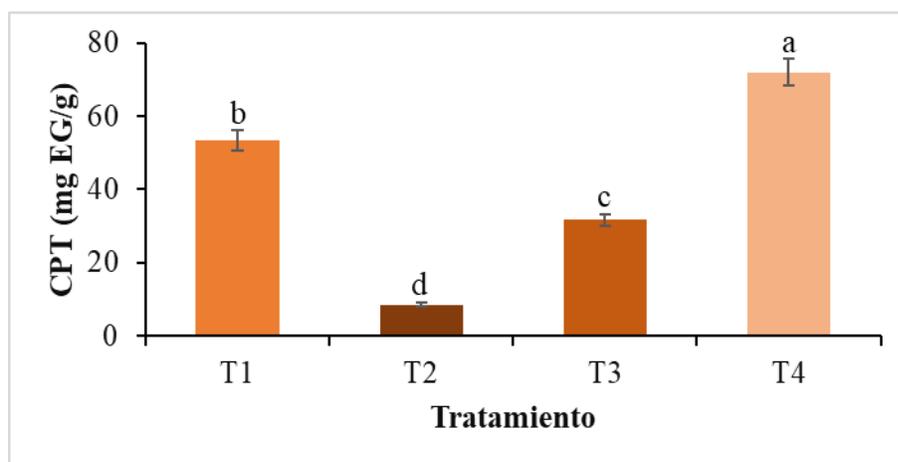
Análisis de polisacáridos (Método fenol-ácido sulfúrico). La determinación del contenido de carbohidratos en alimentos, así como en extractos provenientes de fuentes naturales, es considerada una operación analítica de rutina. El método-fenol-ácido sulfúrico es el método colorimétrico más simple y rápido utilizado para la determinación de carbohidratos, incluyendo mono, di, oligo- y polisacáridos (Nielsen, 2017). Este método consiste en degradar los disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos en monosacáridos, de los cuales las pentosas (compuestos de cinco carbonos) se deshidratan a furfural y las hexosas (compuestos de seis carbonos) se deshidratan a hidroximetil furfural. Enseguida, estos compuestos reaccionan con el fenol, formando un cambio de color de blanco o amarillo pálido a amarillo-anaranjado en la reacción (DuBois *et al.* 1956).

Cabe mencionar que cuando las muestras son ricas en xilosas (pentosa), la curva estándar debe hacerse con xilosa y las lecturas medirse a 480 nm; mientras que, en muestras ricas en azúcares de hexosas, la curva estándar debe realizarse con glucosa y las lecturas medirse a 490 nm (DuBois *et al.* 1956; Nielsen, 2017).

En nuestro trabajo de investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos totales (CPT) presentes en la harina de *C. sinensis* (Figura 3). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para el CPT, el cual se presentó en el orden T4 (72 mg EG/g) > T1 (53.4 mg EG/g) > T3 (31.7 mg EG/g) > T2 (8.6 mg EG/g). Se puede evidenciar que el mejor solvente para la extracción de polisacáridos es agua caliente, esto se justifica gracias a que la glucosa tiene una solubilidad más a fin con el agua; por ello el siguiente extracto con mayor contenido fue el de agua a temperatura ambiente, seguido por la mezcla agua-etanol y por último el extracto con etanol al 95%. Estos resultados son similares a los reportados por Dong y Yao (2008) quienes usaron el mismo método que en el presente estudio. DuBois *et al.* (1956) reportaron un contenido

de polisacáridos de 18.37 ± 0.51 g/100 g de extracto, para extractos acuosos obtenidos a temperaturas elevadas (95-100 °C), a partir del micelio natural *C. sinensis*, mientras que en este mismo estudio se reportan valores de polisacáridos de 28.4 ± 0.05 g/100 g de extracto para el micelio cultivado en laboratorio de extractos acuosos de *C. sinensis* después de ser sometido a un proceso de fermentación en cultivo sumergido. En otro estudio, Zhang *et al.* (2005) reportan un contenido de polisacárido de 877 mg/g para *C. sinensis* obtenido por fermentación en cultivo sumergido en agua.

A nivel industrial y con fines de investigación en laboratorio, el etanol y el agua son uno de los solventes más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos a partir de fuentes naturales, debido a que estos solventes de forma individual o en combinación pueden ser evaporados fácilmente reduciendo los tiempos de extracción y por ende costos de operación. Además, al no ser tóxicos, se aceptan los compuestos extraídos en un gran número de productos para la industria farmacéutica o de los alimentos (Ochoa y Ayala, 2004).



Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-c) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

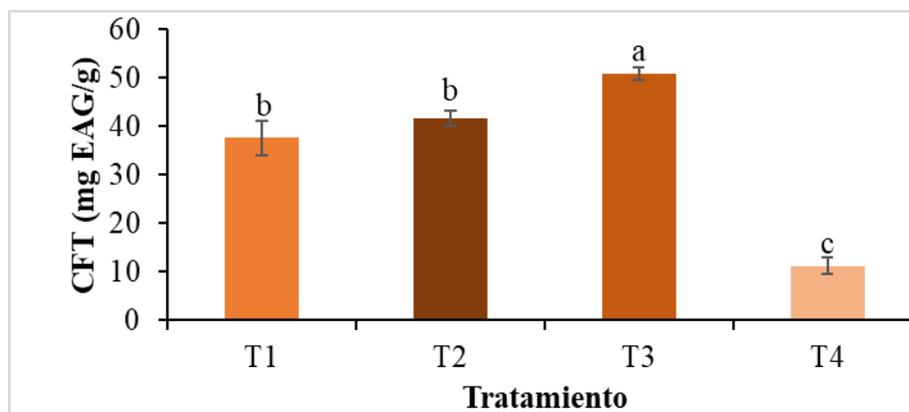
Figura 3. Contenido de Polisacáridos Totales (CPT) en cuatro extractos de *Cordyceps sinensis* usando diferentes solventes, expresados como mg equivalente de glucosa/g (mg EG/g).

En la literatura existe información limitada sobre el contenido de polisacáridos de extractos obtenidos a partir de *C. sinensis* utilizando diferentes solventes de extracción, lo cual incrementa el potencial de nuestro trabajo de investigación. El uso de polisacáridos en la industria tiene función edulcorante natural, gelificante, espesantes, emulsionantes, estabilizadores, sucedáneos. Teniendo función en matrices de productos a partir de lácteos, granos, cárnicos, hortofrutícolas, entre otros (DuBois *et al.* 1956).

Por otra parte, se ha reportado que el contenido de polisacáridos varía dependiendo del método de cultivo (sólido o fermentación en líquido) utilizado para la obtención de micelio (Hsu *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2005). Pero en general la glucosa u otro monosacárido tiende a ser más soluble en agua, por esto se ha encontrado mayor extracción con agua caliente, ya que esta hace que la mezcla sea más homogénea y se obtenga mayor extracción luego del filtrado.

Análisis de fenoles totales (método Folin-Ciocalteu). Las plantas al igual que los hongos silvestres y/o comestibles se caracterizan por producir durante su crecimiento una extraordinaria diversidad de metabolitos fenólicos, es decir, que contienen uno o más residuos hidroxilo ácidos (OH) unidos a un anillo aromático (fenilo) (Ainsworth y Gillespie 2007; Wang *et al.* 2014a). La determinación del contenido de fenoles totales se basa en la transferencia de electrones en un medio alcalino de compuestos que poseen en su estructura grupos OH a complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico para formar complejos azules que son detectados espectrofotométricamente a 760 nm. Este contenido se determina en alimentos y muestras biológicas, utilizando una curva de calibración y comúnmente se reportan como equivalentes de ácido gálico (Ainsworth y Gillespie 2007).

En el presente trabajo de investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el contenido de fenoles totales (CFT) presentes en la harina de *C. sinensis* (Figura 4). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para el CFT, el cual se presentó en el orden T3 (50.7 mg EAG/g) > T1 (37.6 mg EAG/g) = T2 (41.6 mg EAG/g) > T4 (11.2 mg EAG/g). Los resultados de nuestro trabajo de investigación no coinciden con los de Yu *et al.* (2006), quienes reportaron un CFT para harina de *C. sinensis* menor a 0.1 mg EAG/g de extracto acuoso 60 °C. Mientras que Singh *et al.* (2013), reportaron un valor de CFT menor a lo reportado en nuestro estudio (<20 mg EAG/g) en extractos acuosos de *C. sinensis*. No obstante, en acuerdo con nuestros resultados, Mamta *et al.* (2015) reportan un mayor CFT (15.1 + 0.67mg/g) en extractos obtenidos de harina de *C. sinensis*, utilizando como solvente de extracción agua y etanol en una proporción 1:1 en comparación con extractos acuosos. Respecto al extracto obtenido con agua caliente como solvente, Wang *et al.* (2015) reportaron valores similares en el CFT (aproximadamente 12 mg EAG/mg) para extractos de harina de *C. sinensis*, aunque no se especificó la temperatura utilizada durante la extracción. A bajas concentraciones la molécula de ácido gálico tiene mayor solubilidad en alcohol, como el etanol, pero sigue siendo soluble en agua, por lo cual los dos solventes ayudan a la extracción y el valor más alto encontrado de fenoles totales fue el extracto acuoso-etanólico. El extracto etanólico extrajo un poco más de fenoles totales, pero esta diferencia no fue significativa con el extracto acuoso a temperatura ambiente. Por último, el extracto acuoso a 50 °C fue el valor más bajo, probablemente debido a que la solubilidad en agua del ácido gálico es óptima a temperatura ambiente (20 °C).



Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-c) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 4. Contenido de Fenoles Totales (CFT) en cuatro extractos de *Cordyceps sinensis* usando diferentes solventes expresado como mg equivalente de ácido gálico/g (mg EAG/g).

El pardeamiento enzimático es una reacción indeseada en algunos frutos y vegetales, debido a la oxidación de compuestos fenólicos al exponerse al aire, se producen melaninas que causan el oscurecimiento por acción de las enzimas fenolasas. Estas también actúan en la reacción de Maillard a altas temperaturas. Por esto la adición de fenoles a una matriz alimenticia favorece solo a algunas donde sean deseadas estas reacciones, por ejemplo en el café y chocolate, donde por medio de estas reacciones se produce su sabor característico. Por otra parte, también son utilizados por su acción antioxidante y antimicrobiana en productos cosméticos y farmacéuticos como antiinflamatorio y sucedáneo, entre otras (Gerrard 2005).

Análisis de flavonoides totales. Los flavonoides son compuestos hidroxiaromáticos derivados de la ruta del ácido shiquímico y del acetato, cuya estructura básica es el núcleo flavan, que consiste en 15 carbonos arreglados en tres anillos bencenos difenilpropanos ($C_6C_3C_6$) denominados anillos A, B y C (Figura 5), respectivamente (Martínez-Flores *et al.* 2002). Los anillos A y B son fenilos que se unen a través de un anillo C de pirano, el cual en su estructura contiene un heteroátomo de oxígeno. El anillo A y el oxígeno del anillo C, derivan de unidades de acetato proporcionadas por el acetyl CoA, mientras que el anillo B y la unidad de pirano que constituyen el anillo C, se sintetizan a partir de la ruta del ácido shiquímico (Havsteen, 1983). Numerosos estudios indican que los flavonoides tienen una considerable actividad antioxidante. Los flavonoides (Figura 6), son una clase de compuestos polifenólicos, a los cuales se les atribuye varias acciones biológicas y farmacológicas, como prevenir enfermedades cardiovasculares, aumentar la capacidad cognitiva, potencial hepatoprotector, actividades antimicrobianas y antioxidantes (Peluso 2016; Yao *et al.* 2010; Wu *et al.* 2006; Shafaghat *et al.* 2012).

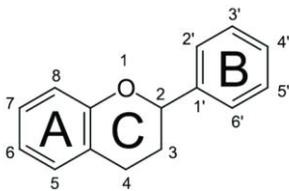


Figura 5. Estructura básica del esqueleto de flavonoides. Fuente: Cartaya y Reynaldo, 2001.

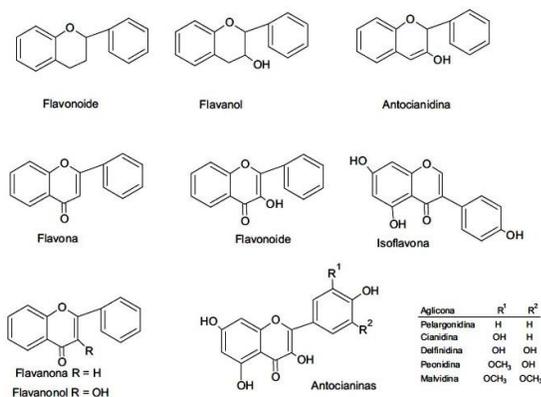


Figura 6. Estructura de los principales flavonoides. Fuente: Sotero *et al.* 2011.

En base a los grupos funcionales que los componen se pueden clasificar de la siguiente manera (Pietta 2000):

- 4-oxo-flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas y flavonoles.
- Sales de flavilium: antocianidinas y antocianinas.
- Isoflavonas: genisteina, genistina, daidzeina, daidzina y biocanina A.
- Derivados flavan 3-ol: catequinas, epicatequinas, epigallocatequinas y taninos.

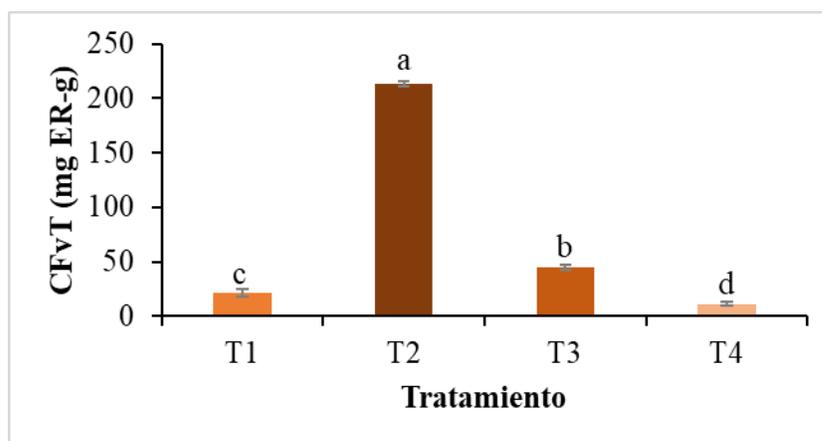
El procedimiento más común para la determinación del CFvT es un ensayo espectrofotométrico, basado en la nitración de cualquier anillo aromático que lleve un grupo catecol con sus tres o cuatro posiciones no sustituidas estéricamente. Después de la adición de Al (III), se forma un complejo de solución amarilla, que cambia a color rojo al agregar NaOH y este complejo puede ser monitoreado a 510 nm (Pekal y Pyrzynska, 2001). En nuestro trabajo de investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el contenido de flavonoides totales (CFvT) presentes en la harina de *C. sinensis* (Figura 7).

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para el CFvT, el cual se presentó en el orden T2 (213.6 mg ER/g) > T3 (44.7 mg ER/g) > T1 (22 mg ER/g) > T4 (11.4 mg ER/g). El menor CFvT encontrado fue en el extracto acuoso a 50 °C, lo cual concuerda con los resultados de Yu *et al.* (2006), quienes reportaron un CFvT en harina de *C. sinensis* menor a 0.001 mg ER/g de extracto acuoso 60°C. Mientras que Singh *et al.* (2013), reportaron un valor muy cercano de CFvT, pero menor a lo reportado en nuestro estudio (aproximadamente 10.6 ± 0.05 mg/g) también usando rutina como estándar para la determinación de CFvT, en extractos acuosos del micelio y cuerpos fructíferos de *C. sinensis* colectado en su hábitat natural. De manera similar a nuestro

estudio Mamta *et al.* (2015) reportaron mayor CFvT en extractos obtenidos de harina de *C. sinensis*, utilizando como solvente de extracción etanol (19.3 + 0.33 mg/g) > agua-etanol 1:1 (17.0 + 0.33 mg/g) > agua (11.3 + 0.33).

A nivel industrial y con fines de investigación en laboratorio, el etanol y el agua son uno de los solventes más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos a partir de fuentes naturales, debido a que estos solventes de forma individual o en combinación pueden ser evaporados fácilmente reduciendo los tiempos de extracción y por ende costos de operación. Además, al no ser tóxicos se aceptan los compuestos extraídos en un gran número de productos para la industria farmacéutica o de los alimentos (Ochoa y Ayala, 2004). 1 g de rutina se disuelve entre 8,000 a 10,000 ml de agua, 650 ml de etanol, 200 ml de agua hirviendo y cerca de 60 ml de etanol hirviendo (Sociedad anónima (PVP) [sin fecha]). Debido a esto el solvente que mayor extracción de flavonoides totales produjo, fue el etanol (T2), seguido del extracto acuoso-etanólico (T3).

Los flavonoides son utilizados en la medicina, en el campo de la epigenética por su acción mutagénica que pueden activar las sirtuinas, enzimas que afectan el metabolismo celular, de forma que regulan la expresión de algunos genes de animales y vegetales. Además, actúan como antioxidantes y tiene la capacidad de reducir la toxicidad de aflatoxinas, por lo cual podría ser usado en granos y alimentos más comúnmente afectados por estas toxinas (Flavonoides.org [sin fecha]).



Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-d) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 7. Contenido de Flavonoides Totales (CFvT) en cuatro extractos de *Cordyceps sinensis* usando diferentes solventes, expresados como mg equivalentes de rutina/g (mg ER/g).

Análisis de flavonas y flavonoles totales. El contenido de flavonoides (flavonas y flavonoles) puede determinarse por varios métodos entre los que se encuentran la cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de gases acoplada a

masas, cromatografía líquida de alta resolución, y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas.

Los métodos de cromatografía de gases y líquida proporcionan información más precisa debido a que ambas herramientas permiten cuantificar e identificar los flavonoides individuales presentes en la muestra. Por otra parte, los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar grupos de flavonoides con estructuras similares, y son utilizados en determinaciones de rutina, aunque presenten limitaciones en sensibilidad y especificidad (Meza-Olmedo 2011).

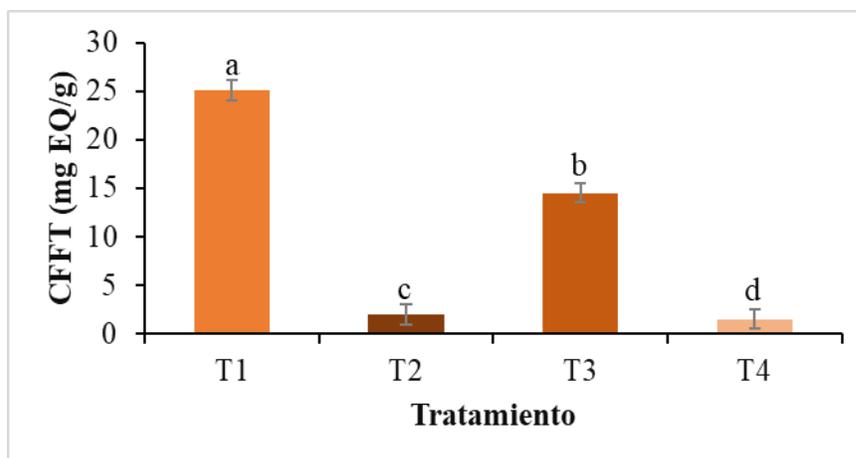
Un método simple utilizado para la determinación de flavonoides, el cual se expresa en términos de flavonas y flavonoles totales, se basa en la formación de un complejo estable entre el cloruro de aluminio (AlCl_3) y los grupos hidroxilo del flavonoide, presentes en los anillos A y B. Estos complejos pueden ser monitoreados a 425 nm (Petry *et al.* 2001).

En el presente trabajo de investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el contenido de flavonas y flavonoles totales (CFFT) presentes en la harina de *C. sinensis* (Figura 8). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos en el CFFT, el cual se presentó en el orden T1 (25.1 mg EQ/g) > T3 (14.5 mg EQ/g) > T2 (2 mg EQ/g) > T4 (1.5 mg EQ/g). No se encontró información en la literatura que indique la determinación de este grupo de compuestos espectrofotométricamente en extractos obtenidos a partir de *C. sinensis*.

A pesar de que la Quercetina es considerada casi insoluble en agua, puede ser que esta se encontrara de forma glucosilada y no en su forma pura como estándar, lo que justifica que su solubilidad en agua fuera para mayor y siguiendo con el extracto acuoso-etanólico. Al ser esta molécula estable a temperaturas y presiones normales, la menor extracción fue obtenida en el extracto acuoso a 50 °C.

Las flavonas y flavonoles al tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorio, teniendo efecto pesticida y fungicida, antiviral y anticancerígeno, por lo cual puede ser especialmente útil en alimentos propensos a ataques por hongos, como en quesos, cárnicos, productos de panadería, entre otros [Flavonoides.org (sin fecha)].

La Quercetina es una flavona ampliamente utilizando desde hace muchos años para la determinación del contenido de flavonas y flavonoles totales. Su presencia medida espectrofotométricamente en la multicelda junto con los tratamientos, habiendo calibrado la curva estándar de Quercetina con un ajuste lineal arriba de 95%. A pesar de ser insoluble en agua, ya que se encuentra dando estructura firma a plantas, sobretodo en tallos y cáscara de cítricos. Esto ayuda a que estas se mantengan firme ante una tormenta o exposición de agua por cualquier medio, pero en ocasiones en algunos alimentos puede estar en su forma glucosilada, y al estar unida a un azúcar, esta se hace hidrofílica y se puede extraer mayor contenido con agua a temperatura ambiente.



Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-d) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 8. Contenido de Flavonas y Flavonoles Totales (CFFT) en cuatro extractos de *Cordyceps sinensis* usando diferentes solventes. Los resultados son expresados como miligramos equivalentes de Quercetina/g (mg EQ/g).

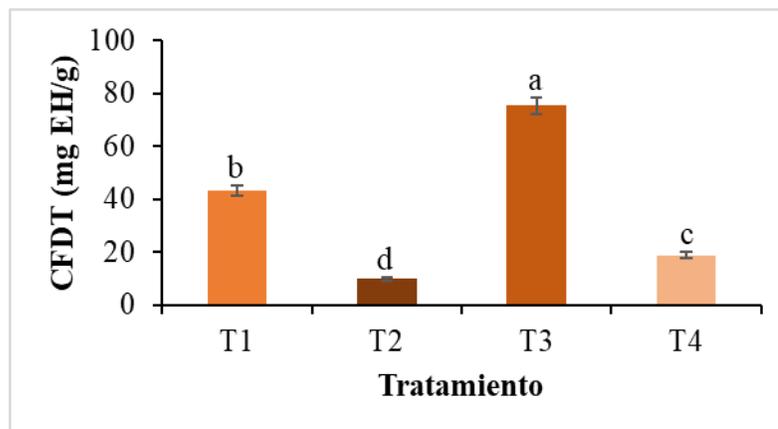
Análisis de flavanonas y dihidroflavonoles totales. El método utilizado para la determinación del contenido flavanonas y dihidroflavonoles totales (CFDT) se basa en la interacción de compuestos fenólicos con DNP (2,4-dinitrofenilhidrazina) en medio ácido (ácido sulfúrico) para formar un complejo (fenilhidrazonas) que puede ser monitoreado a 486 nm (Pekal y Pyrzynska, 2001; Popova *et al.* 2004).

En el presente trabajo de investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el CFDT presentes en la harina de *C. sinensis* (Figura 9). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para el CFDT, el cual se presentó en el orden T3 (75.2 mg EH/g) > T1 (43.3 mg EH/g) > T4 (18.7 mg EH/g) > T2 (9.7 mg EH/g).

No se encontró información en la literatura indicando la determinación de este grupo de compuestos espectrofotométricamente en extractos obtenidos a partir de *C. sinensis*. Sin embargo, se puede decir que la molécula de hesperidina resultó es más soluble en agua en combinación con etanol y que gracias a la constante dieléctrica, la polaridad de cada molécula en el compuesto hacia cada solvente y sometiendo la solución a un campo eléctrico (ultrasonido), se generó mayor extracción de flavanonas y dihidroflavonoles totales. El extracto acuoso a temperatura ambiente fue el segundo mayor, gracias a estas características y que la molécula es más afín al agua.

Las flavanonas y dihidroflavonoles pueden usarse en una matriz alimenticia para evitar la oxidación lipídica, de proteínas, principalmente para aumentar la vida útil de los alimentos, está presente en el té verde, cítricos y algunas otras frutas y vegetales. Estos al ser ácidos,

es recomendado utilizarlos en un ambiente con pH ácido para su correcto funcionamiento (CIHR and TMIC 2007).



Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-d) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 9. CFDT, contenido de flavanonas y dihidroflavonoles totales. Los resultados son expresados como mg equivalentes de Hesperidina/g (mg EH/g).

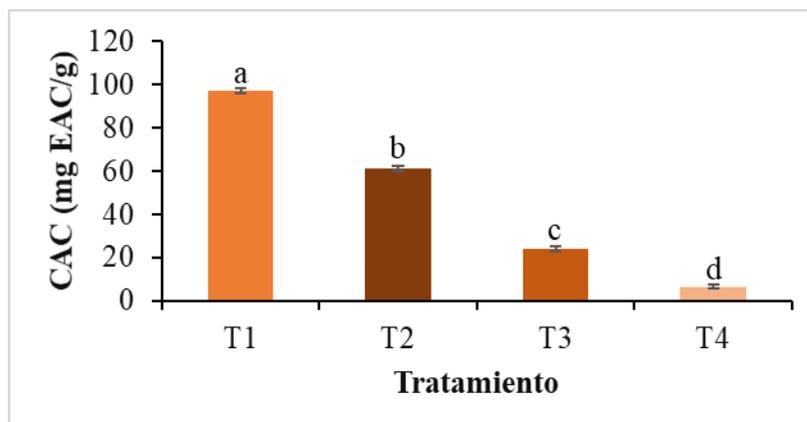
Análisis de contenido de ácido clorogénico (CAC). El término ácido clorogénico describe un rango de ésteres formados entre el ácido quínico y derivados del ácido cinámico sustituidos de diversas maneras. Para la determinación del ácido clorogénico existen una gran variedad de métodos, entre los que se pueden mencionar a los métodos cromatográficos (cromatografía líquida de alta resolución) y colorimétricos (Folin-Denis, etóxido de sodio, molibdato de sodio y nitrito de sodio). Este último se basa en la formación de un complejo estable de color rojo cereza derivado de la interacción entre los grupos funcionales del compuesto fenólico en posición orto-dihidroxi con ácido nítrico (Griffiths *et al.* 1992).

En este trabajo de investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el contenido de ácido clorogénico (CAC) presente en la harina de *C. sinensis* (Figura 10). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para el CAC, el cual se presentó en el orden T1(97.3 mg EAC/g) > T2 (61.3 mg EAC/g) > T3 (24 mg EAC/g) > T4 (6.6 mg EAC/g). El extracto acuoso fue el mejor solvente para la extracción de ácido clorogénico, lo cual puede atribuirse a que en su estructura el ácido clorogénico es el éster formado entre ácido cafeico y la posición 3-hidroxilo de L-ácido quínico, y este tipo de enlaces son más afines a solventes polares (Griffiths *et al.* 1992).

No se encontró información en la literatura que indique la determinación de este grupo de compuestos espectrofotométricamente en extractos obtenidos a partir de *C. sinensis*.

El ácido clorogénico puede ser utilizado en matrices alimenticias donde se quiera características en sabor, color y aroma similares al café o al chocolate, ya que este les brinda

esta característica a estos alimentos, por lo tanto, según los resultados del estudio, se podría utilizar extractos acuosos de la harina de *C. sinensis* en dichas matrices.



Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-d) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 10. Contenido de ácido clorogénico (CAC) en cuatro extractos de *Cordyceps sinensis* usando diferentes solventes. Los resultados son expresados como mg equivalentes de ácido clorogénico (mg EAC/g).

Actividad antirradical DPPH. La molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), es un radical libre estable por la deslocalización del electrón de reserva en conjunto sobre la molécula, de modo que las moléculas no se dimerizan, contrario a la mayoría de otros radicales libres. Dicha deslocalización da lugar al color violeta profundo, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol centrada a 520 nm aproximadamente (Molyneux, 2003). Al mezclarse una solución de DPPH con una sustancia que pueda donar un átomo de hidrógeno como es el caso de los compuestos fenólicos, se da lugar a la forma reducida, con la pérdida del color violeta a un color amarillo pálido residual del grupo picryl todavía presente (Molyneux, 2003; Floegel *et al.* 2011).

En el presente trabajo de investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre la actividad antirradical DPPH de extractos obtenidos a partir de harina de *C. sinensis* (Cuadro 3). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos en la inhibición del radical DPPH, la cual se presentó en el orden T3 (37.7%) > T1 (18.9%) > T2 (11.8%) > T4 (0%) a la concentración más alta evaluada (500 $\mu\text{g/mL}$). El extracto acuoso-etanólico presentó una actividad antirradical más alta debido a que, esta combinación extrajo más compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales se oxidan donando los hidrógenos necesarios para estabilizar la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo no reactiva al reducirse. Por otro lado, mediante la extracción con etanol se lograron extraer más flavonoides y algo de ácido clorogénico, aunque muy poca cantidad de los otros compuestos, por lo cual fue la segunda

con mayor actividad antirradical. El extracto acuoso a 50 °C no presentó actividad antirradical DPPH porque este tenía menos compuestos antioxidantes.

Cuadro 3. Actividad antirradical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (%) de los extractos de *C. sinensis* a diferentes concentraciones (500, 250, 125, 62.5 µg/mL).

Concentración (µg/mL)	T1	T2	T3	T4
500	18.9 ± 0.9 ^b	12.4 ± 2.9 ^a	37.7 ± 2.1 ^c	ND
250	ND	ND	ND	ND
125	ND	ND	ND	ND
62.5	ND	ND	ND	ND

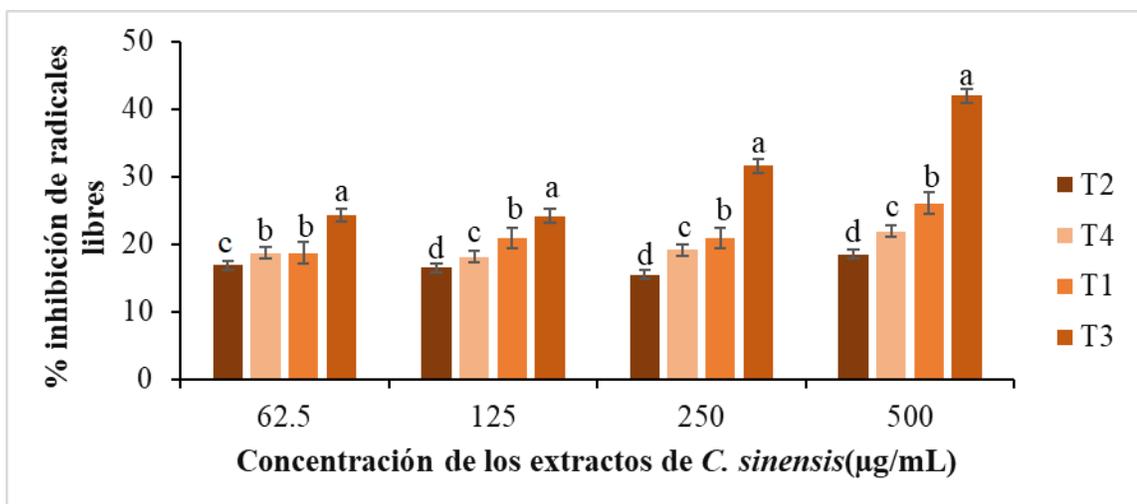
Los datos representan el promedio ± desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C.

Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-c) indican diferencias significativas (P < 0.05). ND: No detectado, siendo el límite mínimo de detección: 10%.

Los resultados de este trabajo de investigación concuerdan con los obtenidos por Wang *et al.* (2015), quienes reportaron valores inferiores al 50% de inhibición del radical DPPH, en extractos de harina de *C. sinensis* (a concentraciones de 0.5 y 1 mg/mL) obtenidos con agua caliente (temperatura no especificada) como solvente de extracción. Mientras que Mamta *et al.* (2015), reportaron la mejor inhibición de radicales DPPH en extractos obtenidos de harina de *C. sinensis* en el orden extracto etanólico > extracto acuoso-etanólico 1:1 > extracto acuoso. Sin embargo, estos extractos fueron obtenidos utilizando estos solventes en combinación con un método de extracción no convencional (extracción acelerada de solventes, ASE 350).

Actividad antirradical ABTS. El método para la determinación de la actividad antirradical ABTS es un ensayo de decoloración aplicable a compuestos antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, incluyendo flavonoides, hidroxycinamatos, carotenoides y otros antioxidantes plasmáticos. Este método consiste en generar radicales mediante oxidación a partir del ácido 2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) con persulfato de potasio. El radical obtenido puede ser reducido en presencia de dichos antioxidantes donadores de hidrógeno, generando un cambio de color del radical a color verde esmeralda, que puede ser monitoreado a 734 nm (Re 1999).

En esta investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre la actividad antirradical ABTS de extractos obtenidos a partir de harina de *C. sinensis* (Figura 11). Los resultados muestran diferencias significativas (P < 0.05) entre tratamientos en la inhibición del radical ABTS, la cual se presentó en el orden T3 (24.4%) > T4 (18.8%) > T1 (18.7%) > T2 (16.9%) a la concentración más alta evaluada (500 µg/mL). Este comportamiento se mantuvo a las concentraciones de 250 y 125 µg/mL; sin embargo, a la más baja concentración el orden de inhibición fue T3 > T1 = T4 > T2.

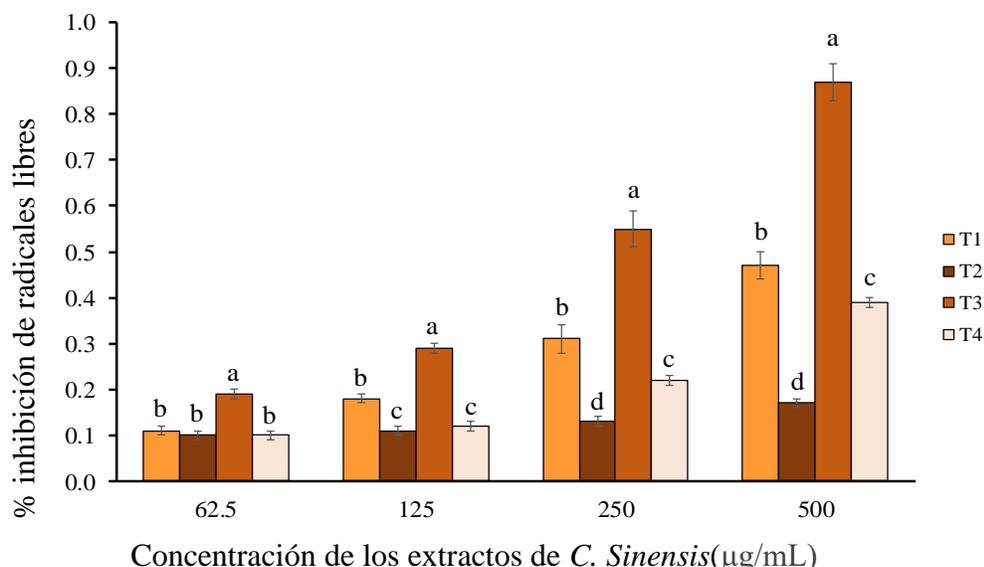


Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-d) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 11. Actividad antirradical 2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS. Los resultados son presentados como porcentaje de inhibición de radicales ABTS a diferentes concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos descritos a continuación.

Poder reductor (método azul Prussiano). La determinación del poder reductor del hierro ($\text{Fe}^{3+} + \text{antioxidante} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{antioxidante oxidado}$) es otro método utilizado para evaluar la actividad antioxidante de alimentos o compuestos y muestras biológicas (Benzie y Strain, 1999; Berker *et al.* 2010). En la presente investigación, se evaluó el efecto del solvente de extracción (agua, etanol, agua-etanol y agua a 50 °C) sobre el poder reductor de extractos obtenidos a partir de harina de *C. sinensis* (Figura 12). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para el poder reductor, el cual se presentó en el orden T3 (0.87 absorbancia) > T4 (0.39 absorbancia) > T1 (0.31 absorbancia) > T2 (0.17 absorbancia) a la concentración más alta evaluada (500 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados podrían guardar relación con la presencia de compuestos que actúan como donadores de hidrógenos, como es el caso de la capacidad de los fenoles de reducir iones metálicos (hierro) o reaccionar con radicales libres, para después estabilizar y terminar la reacción en cadena dada por el radical (Beltrán *et al.* 2016), como es el caso del extracto acuoso-etanólico.

Este comportamiento se mantuvo a las concentraciones de 250 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, a concentraciones de 62.5 y 125 $\mu\text{g/mL}$ el poder reductor se presentó en el orden T3 > T1 = T2 = T4. No hay información en la literatura, que indique la determinación de poder reductor espectrofotométricamente en extractos obtenidos utilizando diferentes solventes de extracción a partir de *C. sinensis*. Sin embargo, en un trabajo realizado por Yu *et al.* (2006) se reportaron valores de poder reductor de aproximadamente 0.7 de absorbancia a 700 nm, en el extracto acuoso 60 °C (0-1 mg/mL) a 0.2 mg/mL obtenido de harina de *C. sinensis*. Estos valores se incrementaron conforme al aumento de la concentración.



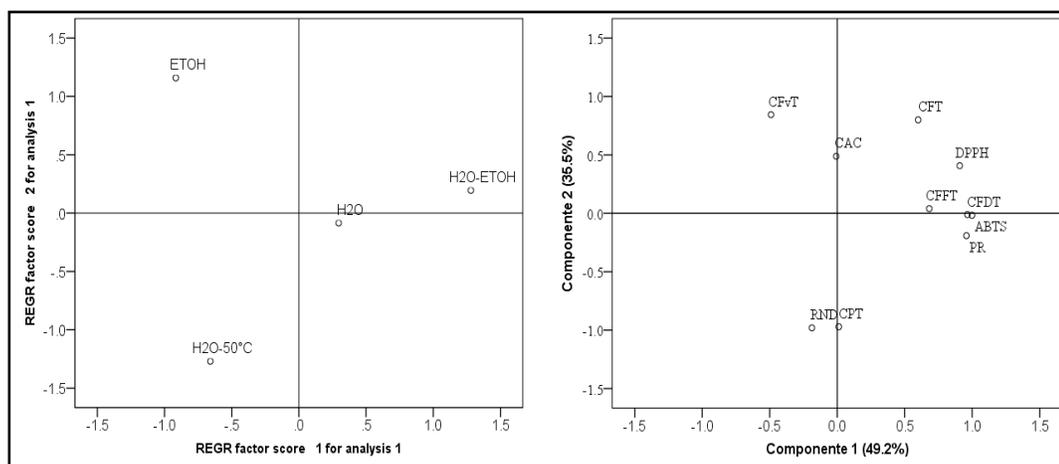
Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. T1, extracto acuoso; T2, extracto etanólico; T3, extracto acuoso-etanólico; T4, extracto acuoso a temperatura de 50 °C. Diferentes literales entre tratamientos a la misma concentración (a-d) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 12. Poder reductor por inhibición de radicales libres de los extractos de *Cordyceps sinensis* a diferentes concentraciones.

Se tomaron tres métodos (ABTS, DPPH, poder reductor) para evaluar la capacidad antirradical y antioxidante de los compuestos en cada extracto, en todos casos el extracto acuoso- etanólico presentó la mayor actividad, ya que este logró extraer más compuestos fenólicos, quienes podrían actuar como donadores de hidrógeno y/o electrones para estabilizar la molécula radical libre. En la Figura 14 se puede apreciar la relación existente entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antirradical encontrada.

Análisis multivariado. En la Figura 13 se muestran los resultados del análisis multivariado (componentes principales) en el cual se establecen las diferencias entre los tratamientos y todas las variables analizadas (contenido de polisacáridos totales, fenoles totales, flavonoides totales, flavonas y flavonoles totales, de flavanonas y dihidroflavonoles totales y de ácido clorogénico). El primer y segundo componente mostraron una variación de 49.2 y 35.5%, respectivamente; por lo tanto, los dos componentes explicaron un acumulativo de 84.7% de la variación total. Además, los resultados mostraron una separación de los tratamientos analizados y la actividad biológica evaluada ($P < 0.05$); por ejemplo, los extractos acuoso-etanólico mostraron la mayor actividad antioxidante (actividad antirradical DPPH y ABTS, así como poder reductor), la cual está asociada a los valores de

contenido de fenoles totales, contenido de flavonas y flavonoles totales, contenido de flavanonas y dihidroflavonoles totales y contenido de ácido clorogénico.



EtOH: Etanol 95%. H₂O: Agua a temperatura ambiente. H₂O-EtOH: Agua + etanol a temperatura ambiente, en una relación 1:1. H₂O-50 °C: Agua a 50 °C.

Figura 13. Análisis multivariado de la relación de los componentes principales (solvente utilizado en cada extracto y su relación con los compuestos bioactivos encontrados en estos, así como su actividad antioxidante (ABTS, DPPH, Poder reductor).

CFvT: Contenido de flavonoides totales. CAC: Contenido de ácido clorogénico. CFT: Contenido de fenoles totales. CFFT: Contenido de flavonas y flavonoles totales. CFDT: Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles totales. CPT: Contenido de polisacáridos totales. ABTS: 2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo. Poder Reductor: Método azul prussiano.

4. CONCLUSIONES

- La harina tuvo un alto contenido de carbohidratos, asociado al medio en el que fue cultivado (harina a partir de un grano básico).
- El mejor solvente para la extracción de compuestos bioactivos fue la combinación etanol-agua relación 1:1 en 100 g de la harina de *Cordyceps sinensis*.
- La mayor actividad antirradical y poder reductor obtenidos según el análisis multivariado indica que el solvente acuoso-etanólico fue el que extrajo más compuestos fenólicos.
- Los extractos de la harina de *Cordyceps sinensis* demostraron tener potencial significativo en actividad antirradical y reductora para ser añadidas posteriormente a una matriz alimenticia.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el mismo sistema de solventes de extracción en combinación con métodos de extracción no convencionales para incrementar el contenido de fitoquímicos y la actividad biológica.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de harina de *Cordyceps sinensis*, frente a patógenos comúnmente encontrados en carne y productos cárnicos.
- Evaluar el efecto de la adición de los extractos o la harina obtenida a partir de *Cordyceps sinensis* sobre la estabilidad oxidativa y microbiológica de productos cárnicos.

6. LITERATURA CITADA

- Ainsworth EA, y Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2(4):875. DOI:10.1038/nprot.2007.102.
- Asghari J, Ondruschka B, Mazaheritehrani M. 2011. Extraction of bioactive chemical compounds from the medicinal Asian plants by microwave irradiation. *Irán: Journal of Medicinal Plants Research*; 5(4):495-506. ISSN 1996-0875. Available online at <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. *Official Methods of Analysis*, 15th edn. AOAC International, Washington DC.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, y Omar AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4):426-436.
- Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, Sant'Ana AS, y Orlien, V. 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 49:96-109.
- Benzie IF, y Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70-76.
- BeMiller. 2017. Carbohydrate analysis, Chapter 15. In: Nielsen Suzanne ed. *Food Analysis*, Food Sciences Text Series, 5th ed. New York, USA: Springer International Publishing. P. 85-104. DOI 10.1007/978-3-319-45776-5_15.
- Berker KI, Güçlü K, Tor İ, Demirata B, y Apak R. 2010. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method. *Food Analytical Methods*. 3(3):154-168.
- Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (award #111062), Alberta Innovates - Health Solutions, and by The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). 2007. Hesperidin. Available in: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04703>.
- Carocho M, y Ferreira IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Cartaya O y Reynaldo I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22(2):5-14. *Cultivos tropicales*. La Habana, Cuba. ISSN: 0258-5936.
- Chang SKC, y Zhang Y. 2017. Protein analysis, Chapter 18. In: Nielsen

- Suzanne ed. Food Analysis, Food Sciences Text Series, 5th ed. New York, USA: Springer International Publishing. P. 85-104. DOI 10.1007/978-3-319-45776-5_15.
- Chen PX, Wang S, Nie S, Marccone M. 2013. Properties of *Cordyceps Sinensis*: A review. Journal of Functional Foods. 13(5):550-569.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.034>.
- Cheung PC. 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. Nutrition Bulletin. 35(4):292-299.
- Crovottoa G, Boffa L, Mantegnaa S, Peregob P, Avogadro M, Cintasc P. 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. Ultrasonics Sonochemistry 15(5): 898-902.
- Beltrán Delgado Y, Quevedo HM, Batista P, Llauradó Maury G, Pérez YL, Bermúdez RC, García Oduardo N, Perraud Gaime I, Moukha S, Cos P. Cuba. 2016. Universidad de Oriete, ISBN 978-959-7003-49-6.
- Dong, CH, y Yao YJ. 2008. In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. LWT-Food Science and Technology. 41(4):669-677.
- DuBois M, Gille K, Hamilton J, Rebers P, y Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28(3):350–356. <http://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Ellefson. 2017. Fat analysis, Chapter 17. In: Nielsen Suzanne ed. Food Analysis, Food Sciences Text Series, 5th ed. New York, USA: Springer International Publishing. P. 85-104. DOI 10.1007/978-3-319-45776-5_15.
- FAO/OMS, 1995-2019. Norma general para los Aditivos Alimentarios. Codex Alimentarius, normas internacionales de los alimentos. Manila, FAO. Roma.
- Falowo AB, Fayemi, PO, y Muchenje V. 2014. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. Food Research International. 64: 171-181. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.022>.
- Flavonoides.org. [sin fecha]. TIPOS DE FLAVONOLES, QUÉ SON Y CUÁLES SON SUS PROPIEDADES.
- Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, y Chun OK. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis. 24(7):1043-1048.
- Gerrard J. 2005. The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications by Harry Nursten. Austr Jou of Chem. 58(10):756-756.
https://doi.org/10.1071/CH0505_BR.
- Griffiths DW, Bain H, y Dale MF. 1992. Development of a rapid colorimetric method for the determination of chlorogenic acid in freeze-dried potato tubers. Journal of the Science of Food and Agriculture. 58(1):41-48. DOI: 10.1002/jsfa.2740580108.
- Harris y Marshall. 2017. Ash analysis, Chapter 15. In: Nielsen Suzanne ed. Food Analysis, Food Sciences Text Series, 5th ed. New York, USA: Springer International Publishing. P. 85-104. DOI 10.1007/978-3-319-45776-5_15.

- Havsteen, B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*. 32(7):1141-1148.
- Hsu TH, Shiao L.H, Hsieh C, y Chang DM. 2001. A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Chemistry*. 78(2002):463–469. DOI: 10.1016/s0308-8146(02)00158-9.
- Leo AJ. 1993. Calculating log Poct from structures. Medicinal Chemistry Project. American Chem. Soci. Claremont, California. DOI:10.1021/cr00020a001.
- Li C, Li Z, Fan M, Cheng W, Long Y, Ding T, y Ming L. 2006. The composition of *Hirsutella sinensis*, anamorph of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(8):800-805.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 4(8):118.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, y Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17(6):271-278.
- Mauer LJ, y Bradley Jr JR. 2017. Moisture and total solids analysis, Chapter 15. In: Nielsen Suzanne ed. *Food Analysis, Food Sciences Text Series*, 5th ed. New York, USA: Springer International Publishing. P. 85-104. DOI 10.1007/978-3-319-45776-5_15.
- Mamta, Mehrotra S, Amitabh, Kirar V, Vats P, Nandi SP, Negi PS, y Misra K. 2015. Phytochemical and antimicrobial activities of Himalayan *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Indian Journal of Experimental Biology*. 53(1):36-43.
- Meza-Olmedo, AM. 2011. Análisis de flavonoides en plantas medicinales por electroforesis capilar y determinación de su actividad biológica. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Tesis. México. Disponible en:<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/23493/Meza%20Olmedo%20Ane-Jo%20Mariana.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin, Journal of Science and Technology*. 26(2): 211-219.
- Ochoa CI, y Ayala AA. 2004. Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad*. 6(2):64-74.
- Oyaizu M. 1986. Studies on Products of Browning Reaction-Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction. Prepared from Glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44(5):307-315. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(98\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(98)00082-7).
- Palacios I, Lozano M, Moro C, D'arrigo M, Rostagno MA, Martínez JA, García-Lafuente A, y Villares A. 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 128(3):674-678.
- Pękal A, y Pyrzynska, K. 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*. 7(9):1776-1782.

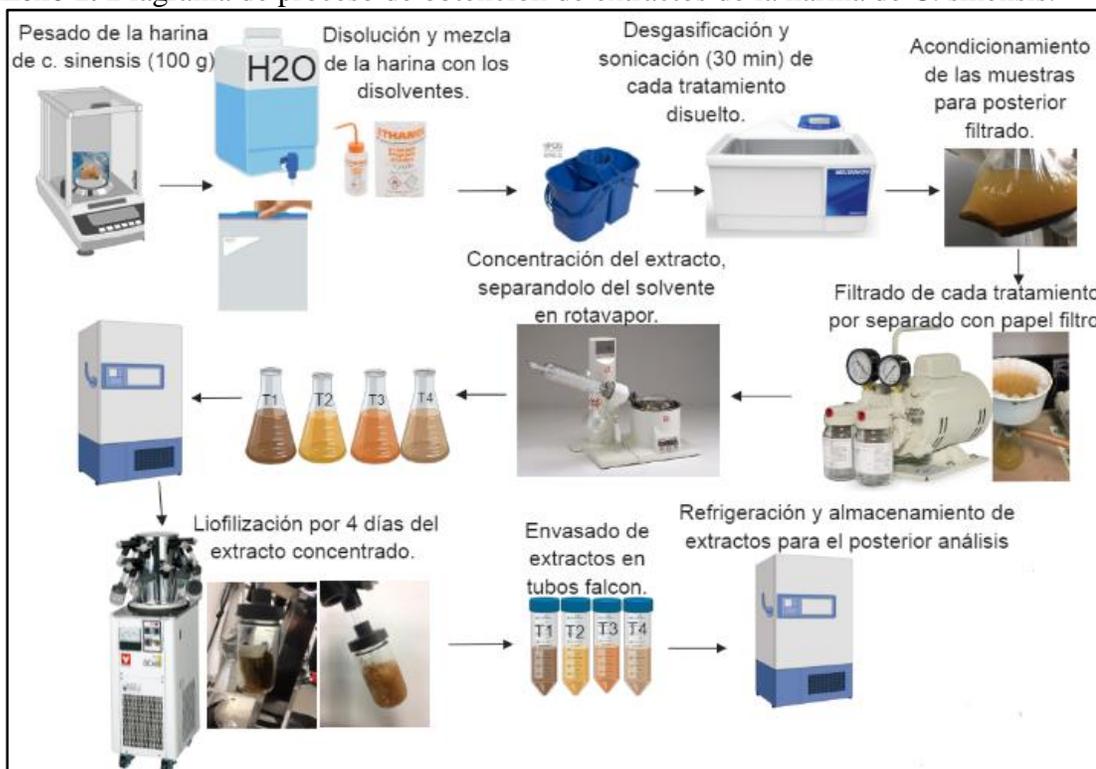
- Peluso MR. 2006. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. Illinois, USA. *Exp Biol Med*, 231(8):1287-1299. doi:10.1177/153537020623100802.
- Petry RD, Gonzalez-Ortega G, Silva, WB. 2001. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on spectrophotometric behavior of the aluminium chloride–flavonoid complex. *Pharmazie*. 56:465-470. Pietta PG. 2000. *Flavonoids as Antioxidants*. *Journal of Natural Products*, 63(7):1035-1042. doi:10.1021/np9904509
- Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova-Damyanova B, Sabatini AG, Marcazzan GL, y Bogdanov S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, 15(4):235-240. <https://doi.org/10.1002/pca.777>.
- Price ML, y Butler LG. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 25(6):1268-1273. <http://doi.org/10.1021/jf60214a034>.
- Qian-Qian T. Yu-Xian Y. Yi-Wen L. Si-Qi Z. Di C. Zhao S. Ai-Ping L. Hong C. Chao-Hui F. Yao-Wen L. Ceng L. Youn-Tao L. 2016. The status of edible mushrooms resource development and nutrition evaluation in Sichuan province, China. Intern. Conf. on biologic. Sci. and Tech. Sichuan Agricultural University. China. Doi: 10.2991/bst-16.2016.34.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, y Rice EC. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10):1231-237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Sethy NK, Singh VK, Sharma S, Sharma RK, Deswal R, Bhargava K, y Mishra, K. 2016. Phytochemical and proteomic analysis of a high altitude medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. *Journal of Proteins & Proteomics*. 7(3):187-197.
- Shafaghat A, Salimi F y Mahmoodi R. Antioxidant, antimicrobial activity and chemical analysis of the flavonoid from *Chaerophyllum macropodium* (Boiss.). *Medicinal plants res*. Vol. 6(11):2111-2116. Islamic Azad University, Iran. DOI: 10.5897/JMPR11.1056
- Shah MA, Bosco SJ, y Mir SA. 2014. Review: Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat science*, Singh M, Tulsawani R, Koganti P, Chauhan A, Manickam M, and Misra K. 2013. *Cordyceps sinensis* Increases Hypoxia Tolerance by Inducing Heme Oxygenase-1 and Metallothionein via Nrf2 Activation in Human Lung Epithelial Cells. *BioMed Research International*. Article ID 569206. 98(1):21-33. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.020>.
- Soares AA, de Souza CG, Daniel FM, Ferrari GP, da Costa SMG, Peralta RM. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei Murriel*) in two stages of maturity. *Food Chemistry*. 112(4):775-781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.117>.

- Sociedad Anónima PVP. [sin fecha]. Rutin NF XI. Brasil. Disponible en: https://web.archive.org/web/20110917010252/http://www.pvp.com.br/EN_rutin_nf_xi_technical_data.htm.
- Sotero V, Maco M, Vela J, Merino C, Dávila E y García D. 2011. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia *Sterculiaceae*. Rev. de la Soc. Quím. del Perú, 77(1):66-74. ISSN 1810-634X.
- Vargas-Sánchez RD, Torrescano-Urrutia GR., Ibarra-Arias FJ, Portillo-Loera JJ, Ríos-Rincón FG, y Sánchez-Escalante A. 2018. Effect of dietary supplementation with *Pleurotus ostreatus* on growth performance and meat quality of Japanese quail. Livestock Science. 207:117-125.
- Wang XM., Zhang J, Wu LH, Zhao YL, Li T, Li JQ, Wang YZ, y Liu HG. 2014a. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. Food Chemistry. 151:279-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.062>
- Wang HJ, Pan MC, Chang CK, Chang SW, y Hsieh CW. 2014b. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of cordycepin from *Cordyceps militaris* using orthogonal experimental design. Molecules. 19(12):20808-20820.
- Wang J, Kan L, Nie S, Chen H, Cui SW, Phillips AO, Phillips GO, Li Y, y Xie, M. 2015. A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*. LWT-Food Science and Technology. 63(1):2-7.
- Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. 1999. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. Food Chem Toxicol. 37(9-10):1027–1038. [doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00085-X).
- Wu Y, Wang F, Zheng Q, Lu L, Yao H, Zhou C, Zhao Y. 2006. Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. Journal of Biom Sci, 13(4):569–578. [doi:10.1007/s11373-006-9081-y](https://doi.org/10.1007/s11373-006-9081-y).
- Xiao JH, Xiao DM, Sun ZH, Xiong Q, Liang ZQ, y Zhong JJ. 2009. Chemical compositions and antimicrobial property of three edible and medicinal *Cordyceps* species. Journal of Food Agriculture Environment. 7(3-4):91-100.
- Yamaguchi Y, Kagota S, Nakamura K, Shinozuka K, Kunitomo M. 2000. Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. Phytother Res. 14(8):647-649. [doi:10.1002/1099-1573\(200012\)14:83.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200012)14:83.0.CO;2-W).
- Yao Y, Han DD, Zhang T & Yang Z. 2010. Quercetin improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia and inhibits voltage-dependent sodium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Phyto Res. Nankai university, China. 24(1):136–140. [doi:10.1002/ptr.2902](https://doi.org/10.1002/ptr.2902).

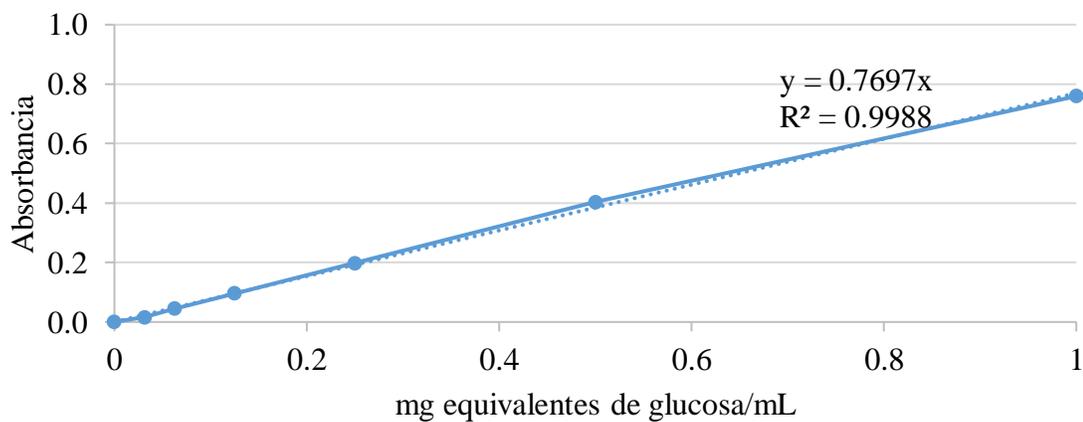
- Yildiz, O., Can, Z., Laghari, A. Q., Şahin, H., & Malkoç, M. (2015). Wild edible mushrooms as a natural source of phenolics and antioxidants. *Journal of Food Biochemistry*, 39(2), 148-154.
- Yu HM, Wang B-S, Huang SC, Duh P-D. 2006. Comparison of protective effects between cultures *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* 54(8):3132-3138. doi:10.1021/jf053111w. Zhang J, Yu Y, Zhang Z, Ding Y, Dai X, y Li Y. 2011. Effect of polysaccharide from cultured *Cordyceps sinensis* on immune function and anti-oxidation activity of mice exposed to ⁶⁰Co. *Intern Immunopharm.* 11(12):2251–2257. Eng. doi: 10.1016/j.intimp.2011.09.019.
- Zhishen, J, Mengcheng T, y Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry.* 64(4):555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).

7. ANEXOS

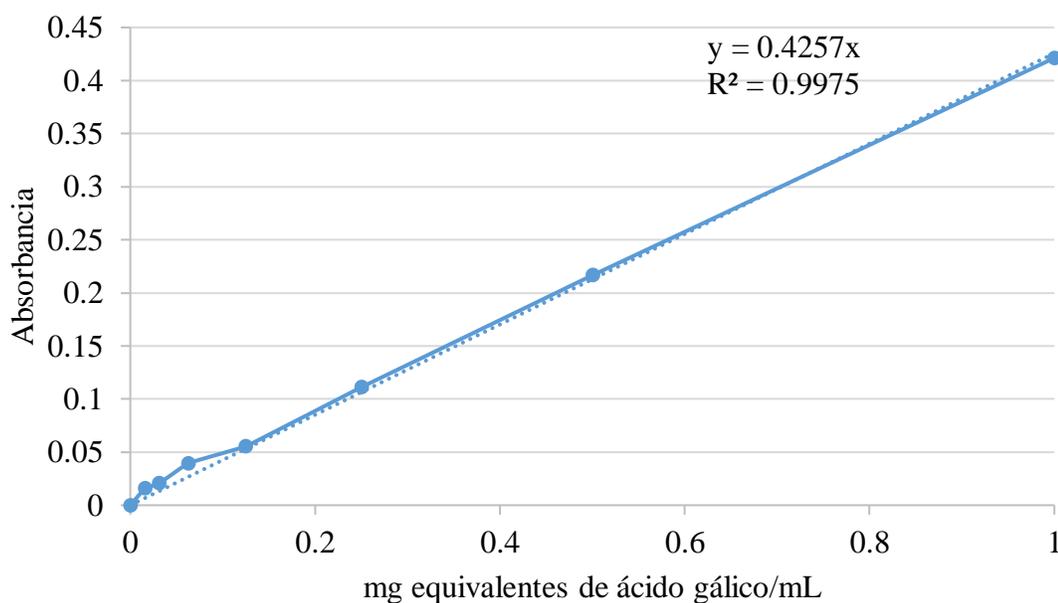
Anexo 1. Diagrama de proceso de obtención de extractos de la harina de *C. sinensis*.



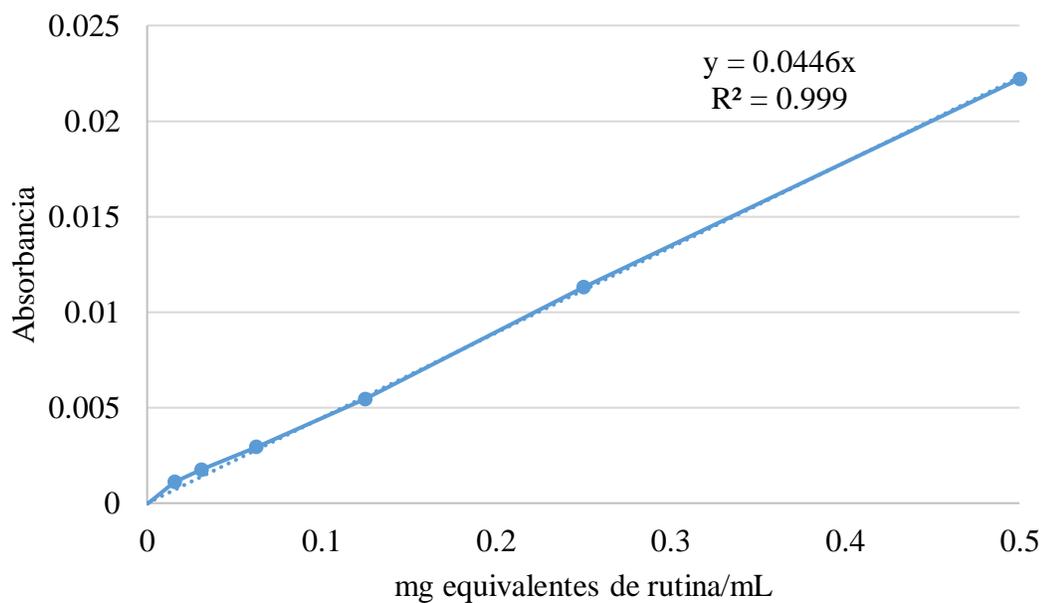
Anexo 2. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de carbohidratos totales.



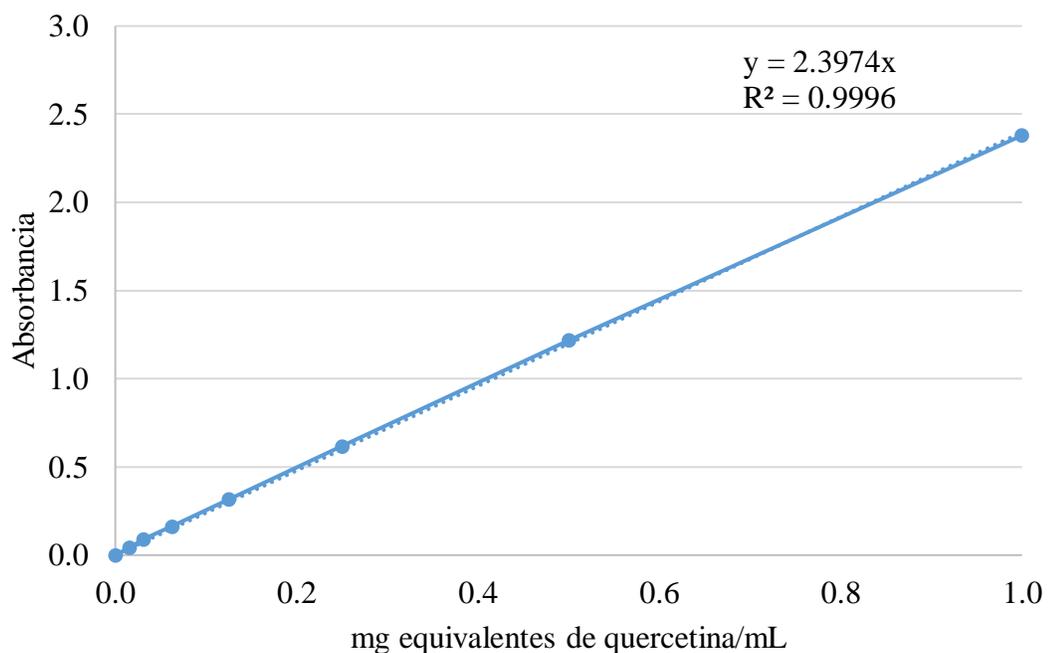
Anexo 3. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de fenoles totales.



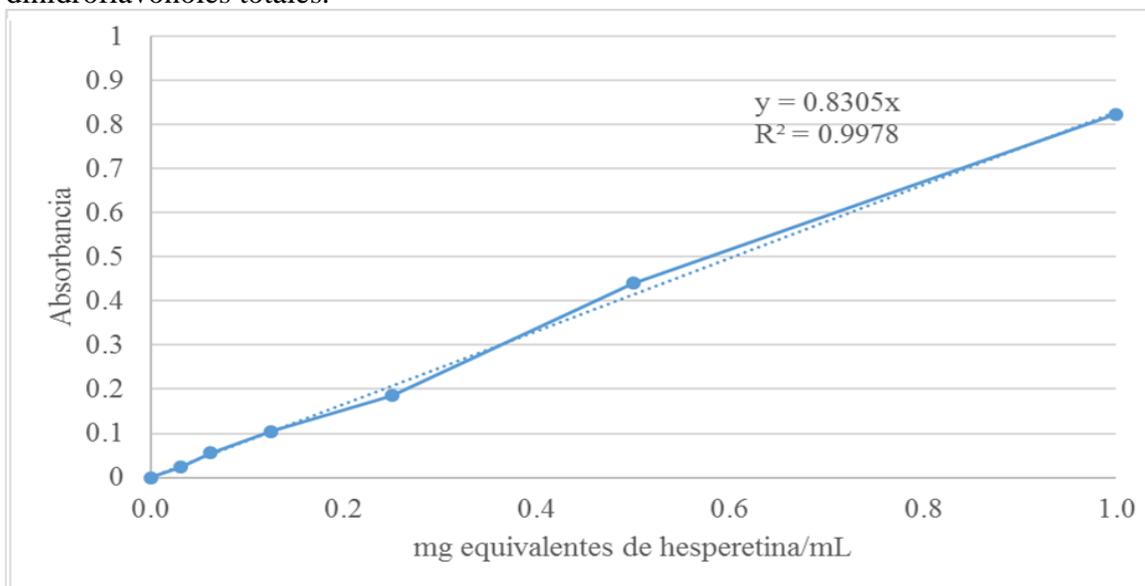
Anexo 4. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de flavonoides totales.



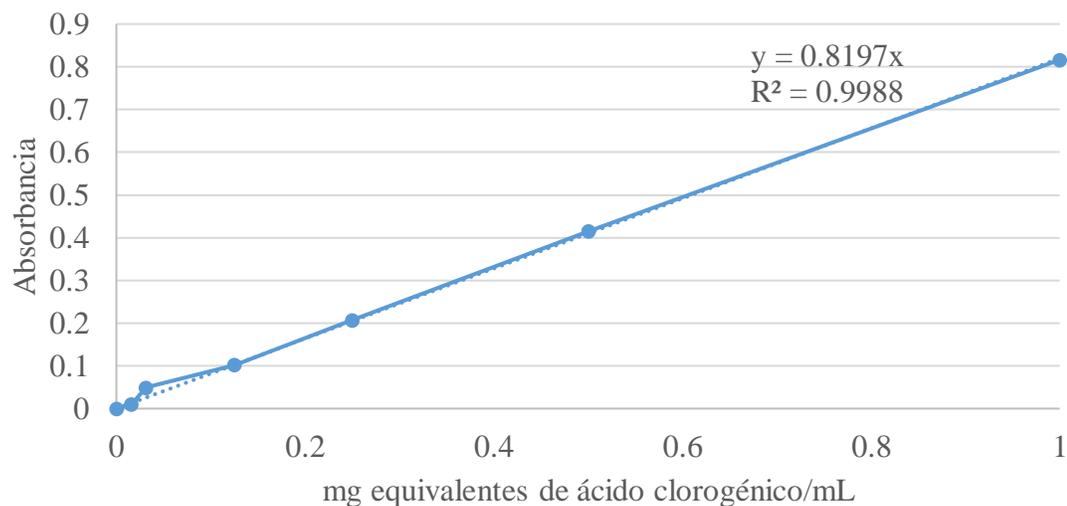
Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de flavonas y flavonoles totales.



Anexo 6. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de flavanonas y dihidroflavonoles totales.



Anexo 7. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de ácido clorogénico total.



Anexo 8. Principales ácidos fenólicos presentes en la naturaleza.

