

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLECULAS BIOACTIVAS DEL
CHORO (*Amanita caesarea*)**

POR:

ALLAN XAVIER AVILA RAMOS

TESIS



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

ABRIL, 2023.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLECULAS BIOACTIVAS DEL
CHORO (*Amanita caesarea*)

POR:

ALLAN XAVIER AVILA RAMOS

JHUNIOR ABRAHAN MARCIA FUENTES M. Sc.
Asesor Principal UNAG

DAVID PICHA PhD.
Asesor LSU AgCenter USA

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENSIÓN DEL TITULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

ABRIL, 2023.

DEDICATORIA

A mi madre **Natalia Ramos Montoya** por ser la inspiración y motivación para seguir adelante y lograr mis metas, por ser siempre un apoyo incondicional en momentos difíciles y un ejemplo a seguir.

A mi padre **Juan Ramón Ávila Gonzales** por su apoyo en cada decisión tomada y por recordarme cada día que se necesita de mucho esfuerzo para lograr lo que se quiere.

A mis hermanos **Ramón Enrique Ávila Ramos y Kevin Gerardo Ávila Ramos** por apoyarme en este proceso académico, ha sido de gran motivación para seguir adelante y lograr mis metas, por ser un apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por su amor y misericordia, por su compañía y fuerzas ya que sin su ayuda no habría podido llegar hasta este momento.

A mi madre **Natalia Ramos Montoya** y a mi padre **Juan Ramón Ávila Ramos** por darme su apoyo, amor y confianza, por estar a mi lado en cada etapa de mi vida y brindarme la oportunidad de poder seguir estudiando

A mi asesores **PhD. Jhunion Abrahan Marcia** quien con su dirección, paciencia y tiempo me guio hasta la culminación de este proyecto.

A mi alma mater la **Universidad Nacional de Agricultura**, por ofrecerme la oportunidad de realizar mis estudios universitarios. El tiempo que pasé en esta casa de estudio dejó huella en mi vida ya que gracias a ella conocí amigos y profesores, los cuales me formaron profesionalmente y me apoyaron en el recorrido, haciendo más placentero el transcurso de mi carrera.

A mis compañeros y amigos, **Maria Jose Castaneda, Marian Yulissa Adriano, Lenin Jose Arita Erazo, Emerson Enoc Figueroa Caceres, Cristian Obed Acosta Carias, Nelson Uriel Aguilar Laínez, Raul Adalberto Cortez Pinot y Dany Joel Avila Diaz** por ser parte fundamental de muchos eventos y proyectos realizados en mi vida universitaria, se convirtieron en experiencias maravillosas e inolvidables gracias a su agradable compañía.

A mis familiares **Paola Lara, Roberto Santos, Blanca Mejía, Marco Tulio González, Amparo González, Irma Gonzales y Bertha Avila** por ser un apoyo fundamental e incondicional durante mi formación académica.

A mi Novia **Sara Esther Maldonado Erazo** por ser una compañía idónea y apoyarme, motivarme en todos los aspectos y de esta manera fortalecer mis debilidades y llegar a cumplir mis objetivos exitosamente.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
IV. REVISION DE LITERATURA.....	5
4.1 El choro (<i>Amanita caesarea</i>).....	5
4.1.1 Clasificación taxonómica de choro (<i>Amanita caesarea</i>).....	6
4.1.2 Morfología del choro	6
4.1.3 Nutrición.....	7
4.2 Antecedentes.....	8
4.4 Diferentes clases de fitoquímicos	9
4.4.1 Fitoesteroles	10
4.4.2 Polifenoles	10
4.4.3 Fitoesteroles.....	11
4.5 Técnicas generales de extracción y caracterización de compuestos fenólicos	11
4.5.1 Extracción de fluidos a presión (PFE).....	12
4.6 La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	13
4.6.1 Cromatografía de Gases.....	15
4.6.2 Descripción del Cromatógrafo de Gases	16
V. MATERIALES Y EQUIPO	17
5.1 Descripción del lugar donde se desarrollará la investigación.....	17
5.2 Material vegetal	17
5.3 Ensayo de actividad de captación de radicales y polifenoles totales.....	17
5.4 Diseño de experimentos.....	19
5.5 Contenido total de carotenoides.....	19

5.6 Determinación por HPLC de azúcares y ácidos orgánicos.....	21
5.6.1 Preparación de patrones y muestras.....	21
5.6.2 Operación HPLC	21
5.6.3 Estándares de ácidos orgánicos	22
5.7 Análisis estadísticos.....	22
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1 Actividad antioxidante.....	23
6.2 Perfil de ácidos orgánicos.....	23
VII. CONCLUSIONES.....	25
VIII. RECOMENDACIONES.....	26
IX. BIBLIOGRAFIA.....	27
ANEXOS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amanita Caesarea.....	6
--	---

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del <i>Amanita caesarea</i>	6
Tabla 2. Contenido de fenoles totales, contenido de carotenoides totales y actividad antioxidante de diferentes plantas.....	23
Tabla 3. Perfil de azúcar de fuentes vegetales SM y AC.	24
Tabla 4. Perfil de ácidos orgánicos de diferentes plantas.	24

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Recolección del material vegetativo	31
Anexo 2. Pesado	31
Anexo 3. Medido	32
Anexo 4. Choro en rejillas.....	32
Anexo 5. Deshidratado	33
Anexo 6. Molido.....	33
Anexo 7. Tamizado.....	34
Anexo 8. Producto final.....	34
Anexo 9. Equipo	35
Anexo 10. Reactivos.....	35
Anexo 11. Repeticiones.....	36
Anexo 12. Muestras diluidas	36
Anexo 13. Cromatografía	37

RESUMEN

Debido a la falta de seguridad alimentaria en países en vías de desarrollo como Honduras, es necesario estudiar nuevas fuentes de alimentación en este caso un hongo llamado Choro *Amanita Caesarea*, el cual solo se encuentra en el municipio de Intibucá, Departamento de Esperanza, Honduras. En mayo y junio, especialmente después del primero de mayo, llovió en las montañas más altas de este lugar. Se come como cualquier comida típica durante esta temporada. En ese sentido, el objetivo de este trabajo fue estandarizar la harina de choro, conociendo el peso y la longitud de cada choro antes y después de la deshidratación. Calcular la pérdida de agua durante el proceso de liofilización, así como la molienda y el tamizado, para obtener una harina cuyo valor de moléculas bioactivas serán evaluadas mediante diferentes estudios y equipo de laboratorio; revelándose los resultados, se obtuvo el compuesto fenólico total del material vegetal, un compuesto carotenoide total, la actividad antioxidante, el perfil de azúcar y el perfil de ácido como una fuente nutricional de compuestos bioactivos, que promueven la salud que vale la pena explorar.

(Ramos, 2022)

Palabras claves: Hongos, Compuestos Bioactivos, Harina, Nutricional, Explora, Salud.

I. INTRODUCCIÓN

A continuación, se ha recopilado la información necesaria para interesar al lector sobre el tema del hongo *Amanita Caesarea*; el cual mantenerlo a mano y utilizarlo con fines académicos e informativos; Donde apreciar propiedades químicas representativas de moléculas bioactivas del hongo, que ayudan a comprender mejor y más profundamente el tema mencionado.

La bioactividad de los metabolitos secundarios empezó a ser estudiada a través de experimentación in vivo en plantas venenosas. Aún en la actualidad, la industria farmacéutica aprovecha los beneficios que éstas le ofrecen al hombre, razón por la que es uno de los principales sectores en explotación vegetal. Sin embargo, a pesar de los grandes proyectos de protección y conservación de la biodiversidad mundial, los hábitats que albergan plantas que acumulan metabolitos secundarios bioactivos aún son desentendidos de estudios, lo cual pone en riesgo la supervivencia y aprovechamiento de estas especies (Aguilar-Støen y Moe 2007).

Los compuestos bioactivos han sido de gran interés debido a que son sintetizados por vías metabólicas complejas y regulados de maneras sofisticadas (Suárez y Coy 2016) (Yazaki, 2004). Por tanto, el poder comprenderlas representa una oportunidad grande para el aprovechamiento de los beneficios que pueden ofrecer para la salud humana, animal y vegetal.

El choro (*Amanita caesarea*) es un hongo conocida comúnmente en la región occidental de Honduras como choro sol, cumba roja o simplemente choro; Esta es la única especie explotada y comercializada en el occidente de Honduras y para su comercialización se han

popularizado festivales gastronómicos llamados festivales del choro, en las comunidades de La Esperanza y Cabañas, en el departamento de Intibucá, (Sarmiento y Fontecha 2015). No obstante, el contenido de moléculas bioactivas se desconoce información. Por lo tanto, el presente estudio se planteó como objetivo, evaluar y caracterizar la presencia de moléculas bioactivas de la harina de choro (*Amanita caesarea*) y obtener un ingrediente funcional para promover la buena salud en los seres humanos.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

- Determinar el contenido de moléculas bioactivas de la harina de choro (*Amanita caesarea*) mediante análisis espectrofotométricos y cromatógrafos.

2.2. Objetivos específicos.

- Obtener el perfil de ácidos orgánicos de la harina de choro mediante métodos espectrofotométricos
- Validar el perfil de azúcares de la harina de choro (*Amanita caesarea*) a través de las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución HPLC.
- Identificar los compuestos bioactivos de la harina de choro mediante programas Scifinder y Pubchem.

IV. REVISION DE LITERATURA

4.1 El choro (*Amanita caesarea*)

La *Amanita caesarea* es conocida comúnmente en la región occidental de Honduras como choro sol, cumba roja o simplemente choro. Esta es la única especie explotada y comercializada en el occidente de Honduras; Para su comercialización se han popularizado festivales gastronómicos llamados festivales del choro, en las comunidades de La Esperanza y Cabañas, en el departamento de Intibucá (Sarmiento y Fontecha 2015).

La temporada de recolección y comercialización de hongos en la región occidental de Honduras es a inicios de la época lluviosa y dura aproximadamente un mes, dependiendo de la cantidad y los períodos de lluvia. Pero, en algunas ocasiones la aparición de las especies de hongos comestibles es escasa. Los recolectores de hongos son principalmente agricultores o personas dedicadas a las labores domésticas, quienes desempeñan esta tarea como una segunda actividad, ya que el período de colecta es corto; no se conocen personas que se dediquen a esta actividad permanente ni exclusivamente (Sarmiento y Fontecha 2015).

Su apariencia peculiar y sabor único lo han convertido en la mayor atracción turística – gastronómica de la zona, esto los ha hecho merecedores de ocupar el lugar 11 en la lista de las 30 maravillas de Honduras. Se atribuye el origen del choro a Europa y el norte de África, no se conoce con exactitud la forma en que llegaron a Honduras. Tienen un píleo o “sombrero” que mide entre 8 y 20 centímetros, es de color anaranjado rojizo y de color amarillo en el tallo, algunas otras variedades de este hongo tienen un color azulado (Arbañil 2022).



Figura 1. *Amanita Caesarea*

4.1.1 Clasificación taxonómica de choro (*Amanita caesarea*)

Tabla 1. Clasificación taxonómica del *Amanita caesarea*

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Amanitaceae
Genero	<i>Amanita</i>
Especie	<i>A. caesarea</i>

Fuente:(Persoon 1821)

4.1.2 Morfología del choro

El sombrero de *A. muscaria* es de gran tamaño, llegando a alcanzar los 25 cm de diámetro. Presenta un color anaranjado característico (que recuerda a la yema de huevo). Su textura es compacta y carnosa. Durante los primeros días el sombrero tiene una forma ovoide y está

recubierto por un velo, al crecer se torna convexo, siendo plano en las setas de más edad y presentando el borde estriado, muy característico. El sombrero crece desde dentro de una cutícula o volva, el velo, de color blanco. Esta es fácil de separar y con el tiempo queda al pie de la seta con forma convexa. En el interior del sombrero las láminas son de color amarillo dorado y son libres respecto al pie y están muy juntas. El pie puede alcanzar más de 10 cm de alto y un grosor de 3 cm, su interior es hueco y se encuentra recubierto de una sustancia algodonosa. El pie presenta un anillo durante todo el crecimiento de la seta (Contreras 2013).|

4.1.3 Nutrición

El hongo *Amanita caesarea* tiene forma de vida simbiótica forma asociación mutualista de simbiosis con las plantas vasculares que le sirven de hospedadoras; esta simbiosis se establece por formación de ectomicorrizas. Este tipo de micorrizas no se forma dentro de las raíces de las plantas vasculares, si no que el hongo forma una capa densa de hifas en la superficie de las raíces; las ectomicorrizas son de importancia fundamental en muchos ecosistemas. Los hongos en simbiosis ectomicorriza excretan una gama de compuestos químicos, que cambian las características del suelo. Por ejemplo, pueden disolver rocas por la acción de ácidos orgánico y tomar de los minerales que las conforman: el nitrógeno y el fosforo (Equipo Editorial 2019).

4.2 Antecedentes

Los compuestos bioactivos son constituyentes que se producen naturalmente en pequeñas cantidades en las plantas y frutos (Kris-Etherton *et al.* 2002). Muchos de los compuestos bioactivos incluyen metabolitos secundarios estructuralmente variados entre los que se cuentan las micotoxinas, alcaloides, factores de crecimiento en las planta, compuestos fenólicos, lignanos, salicilatos, estanoles, esteroides, glicosinolatos, entre otros (Hooper y Cassidy 2006).

Dentro del grupo de los compuestos fenólicos mencionados anteriormente, se incluyen los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, entre otros. De hecho, las plantas poseen tan alto contenido de compuestos fenólicos que son consideradas excelente fuente para aplicaciones terapéuticas, nutricionales y fitoquímicas debido a las propiedades alelopáticas, antifúngicas, bactericidas, entre otras, que poseen (Singh Nee Nigam, Gupta, y Anthwal 2009).

Otra clase importante de compuestos fenólicos son los ácidos fenólicos; se caracterizan por poseer funciones bioactivas y encontrarse en un gran número de plantas y alimentos. Pueden dividirse en dos subgrupos de acuerdo a su estructura: ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinnámicos. Los ácidos hidroxibenzóicos más comunes incluyen el ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, vainillina y ácido siríngico. Por su parte, los ácidos hidroxicinnámicos más comunes son el caféico, ferúlico, p-cumárico y sinápico (Conforti *et al.*, 2009).

Respecto al grupo de los flavonoides, el mayor número de flavonoides, flavonoles, flavonas, flavononas, flavonoles, isoflavonas y antocianinas, resultan de variaciones estructurales que se producen por sustituciones selectivas en sus anillos. La Figura 4 muestra ejemplos de los

flavonoides que se presentan con mayor frecuencia en la naturaleza, siendo los flavonoides los compuestos que constituyen el grupo más grande de los fenoles (Puri, B. y Hall 1998).

4.3 Importancia de los compuestos bioactivos

han sido de gran interés debido a que son sintetizados por vías metabólicas complejas y regulados de maneras sofisticadas (Cruz y González 1999). Por tanto, el poder comprenderlas representa una oportunidad grande para el aprovechamiento de los beneficios que pueden ofrecer para la salud humana, animal y vegetal. Dentro de los mecanismos de acción que han sido demostrados se describen la capacidad de reducir la incidencia de ciertas enfermedades severas ocasionadas por hongos y bacterias, reducir el crecimiento del tubo germinativo en hongos, reducir la germinación de esporas de bacterias y hongos, inhibir la síntesis de proteínas, modular la estructura de micro túbulos, entre muchos otros efectos (Pérez *et al.*, 2008).

4.4 Diferentes clases de fitoquímicos

Existen diferentes tipos de fitoquímicos. Entre ellos, los fitoesteroles, que se encuentran en los vegetales de hoja verde, en frutos secos, en semillas o en legumbres. También los polifenoles, presentes en frutas, como las uvas y los cítricos; en verduras, como la remolacha y berenjena, o en legumbres como las lentejas; Otro ejemplo son los terpenos, que destacan en los vegetales de hoja verde y en los productos derivados de la soja. Finalmente, los tioles, mayoritariamente en vegetales crucíferos como el ajo y la cebolla; Pero no solo los fitoquímicos forman parte de los compuestos bioactivos. Existen otros componentes que también se incluyen en este grupo. Son, por ejemplo, la fibra dietética, los prebióticos y probióticos y las vitaminas y minerales (Suárez y Coy 2016).

4.4.1 Fitoesteroles

Los fitoesteroles son esteroides de origen vegetal. Su efecto hipocolesterolemizante se conoce desde el año 1950. Su uso como droga hipolipémica ha sido limitado debido a que, inicialmente el mercado para el tratamiento de la dislipemia era muy pequeño, y posteriormente, al advenimiento contundente de las estatinas. Por la década de 1980, se empezó a evaluar la posibilidad de usarlos como aditivos alimentarios teniendo en cuenta que los fitoesteroides son productos naturales y constituyentes nutritivos de la dieta usual. La naturaleza lipídica de los mismos hizo que la margarina, los quesos grasos y el yogurt sean los primeros productos de consumo adicionados con esteroides vegetales que salieran al mercado (Bernabo y Dominelli 2002).

4.4.2 Polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al.*, 2012).

4.4.3 Fitoesteroles

Los fitoesteroles son factores alimentarios que reducen la absorción de colesterol en el intestino por competencia, ya que poseen una estructura química similar al colesterol. Una dieta rica en fitoesteroles puede reducir el colesterol total y el colesterol LDL (dañino para la salud); los fitoesteroles y sus productos de reducción química los fitoestanoles, son esteroides de origen vegetal que tienen amplia distribución en la naturaleza. Corresponden a metabolitos secundarios de las plantas, que son sintetizados y utilizados por las células, y aunque no son esenciales tienen un papel fundamental en la sobrevivencia de las plantas. Son compuestos claves en la formación de microdominios (agregados de lípidos que compartimentan procesos celulares) en la membrana plasmática (Silva *et al.*, 2016).

Además, desempeñan un papel esencial en la regulación de la fluidez y permeabilidad de la membrana. Son precursores hormonales, involucrados en el proceso de embriogénesis de la planta, tienen un papel fundamental en el crecimiento y en los procesos de desarrollo a través de la división celular, como también en la morfogénesis. Participan en la defensa de la planta frente a diferentes estreses bióticos o abióticos, actuando como señales moleculares dentro de la planta o entre la planta y su entorno (condiciones ambientales o presencia de microorganismos) (Silva *et al.*, 2016).

4.5 Técnicas generales de extracción y caracterización de compuestos fenólicos

En la última década se han aplicado diferentes metodologías para evaluar bioactivos compuestos en los sistemas de extracción. Sistemas de extracción avanzados que han sido implementados incluyen métodos novedosos como ultrasonido, fluidos supercríticos, fluidos presurizados o extracción asistida por microondas (Nastić *et al.*, 2018). Las ventajas de estas nuevas técnicas en comparación a los métodos de extracción convencionales, son que

aumentan el rendimiento de extracción, más eficiente, aceleran el proceso, la cantidad de solvente requerido y más ecológico (Marcía Fuentes *et al.*, 2021).

Sin embargo, estudios recientes sobre la extracción de moléculas bioactivas del frijol fruit determinó que el método de fluido a presión es el más apropiado para obteniendo altos rendimientos de recuperación para este tipo de moléculas (Fuentes Jhuniór *et al.*, 2021).

4.5.1 Extracción de fluidos a presión (PFE)

La extracción por fluidos a presión (PLE) es una técnica muy útil en el caso de las plantas, facilitando y mejorando la extracción de compuestos polares en este tipo de matrices (Marcía Fuentes *et al.*, 2021). Se basa en la extracción, generalmente sólida, material en el que el disolvente líquido se encuentra a una temperatura superior a su punto de ebullición. Sin embargo, logró mantenerlo en estado líquido debido a las altas presiones. Esta combinación de altas temperaturas y presiones aumenta la velocidad y la eficiencia de extracción, mejora el rendimiento y reduce el tiempo de extracción.

Específicamente, el aumento de la temperatura de extracción mejora la solubilidad y transferencia de los compuestos de interés al solvente de extracción. También reduce la viscosidad y tensión superficial del solvente que le permite llegar más fácilmente a todas las áreas de la matriz y mejorando así el rendimiento de extracción (Leyva-Jiménez *et al.*, 2018).

El disolvente de extracción generalmente utilizado para este tipo de compuestos polares es el agua y sus mezclas hidroalcohólicas, principalmente etanol. El etanol tiene la ventaja de ser económicamente accesible en comparación con otros disolventes utilizados en métodos convencionales. Además, no es peligroso y está incluido en la lista de disolventes GRAS (generalmente es reconocido como seguro). No contamina el medio ambiente, por lo que su uso significa que el proceso de aplicación y se puede considerarse una tecnología verde (Zhang *et al.*, 2019).

El sistema de aparatos de un extractor de fluido presurizado consiste en un tanque de solvente, un bomba de alta presión, celdas de extracción, horno y válvulas. El solvente fluye a través la celda y realiza la extracción a la temperatura seleccionada y se deposita en un frasco de colección. Después de la extracción, el sistema se purga con gas nitrógeno (UJA 2018).

4.6. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es una técnica de separación y la determinación de analitos se realiza tras la separación de los diferentes compuestos de la muestra. La fase estacionaria se fija a una columna de pequeño diámetro, mientras que la fase móvil se pasa por presión. Ambas fases son inmiscibles, por lo que muestra componentes que tienen una mayor afinidad por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que los componentes con menor afinidad por la fase estacionaria se mueven más rápido. Como resultado de la diferente movilidad, los componentes de la muestra son separados, y los diferentes compuestos se pueden recoger en fracciones para el análisis cualitativo. Es importante notar que este proceso de separación resulta en una dilución de los analitos (Marcía-Fuentes *et al.*, 2021).

Los componentes básicos de una HPLC son tanque de fase móvil bombas, un sistema de inyección de muestra, la columna que contiene la fase estacionaria, el detector, y un sistema de procesamiento de datos que genera el cronograma. En el caso de elución en gradiente, la fase móvil es una mezcla de diferentes disolventes de varias polaridades cuya composición de relación cambia a lo largo del elución cromatográfica donde una fase móvil puede estar compuesta de una más polar eluyente A (normalmente agua + ácido fórmico/acético/etc.) o un eluyente B más apolar (normalmente acetonitrilo o metanol) durante todo el proceso (Fuentes Jhunion *et al.*, 2021)

Los gradientes utilizados para los compuestos fenólicos parten de un pequeño porcentaje de la fase orgánica (generalmente acetonitrilo o metanol) y acaban con porcentajes elevados de estos disolventes. Los ácidos utilizados no deben ser demasiado fuertes para evitar daños a la columna, y deben ser ajustados al pH dentro del rango de valores aceptados por la fase estacionaria, así como permitir una buena ionización de los compuestos cuando la detección de analitos es llevado a cabo por el detector de espectrometría de masas (Marcía-Fuentes *et al.*, 2021).

Las fases estacionarias pueden ser sólidas y/o líquidas y, en el análisis de fenólicos compuestos, los más utilizados son los que tienen rellenos de sílice modificada químicamente con cadenas hidrocarbonadas, generalmente n-octilo (C-8) o n-octadecilo (C-18), con partículas tamaños que oscilan entre 1,8 y 5 μm . Teniendo en cuenta las polaridades del móvil fase y la fase estacionaria, las separaciones cromatográficas de estos compuestos se llevan a cabo generalmente en fase inversa o inversa (Fuentes Jhunior *et al.*, 2021).

Finalmente, la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos separados por HPLC puede llevarse a cabo utilizando un espectrómetro de masas (MS). Este se coloca en la salida de la columna y genera una señal analítica que conduce al cromatograma. Es importante señalar que el efluente que sale de la columna cromatográfica (fase móvil líquida) debe ser convertido en un gas que contenga la analitos cargados. La ionización por electrospray (ESI), es muy adecuada para lograr el propósito e ioniza los compuestos positivamente o negativamente dependiendo del modo seleccionado. La espectrometría de masas se basa en la separación de estos iones según a su relación masa/carga (m/z), y su posterior detección puede registrarse en software y emparejar con un compuesto de una relación masa/carga similar (Marcía-Fuentes *et al.*, 2021).

4.6.1 Cromatografía de Gases

Entre las técnicas de cromatografías utilizadas con fines analíticos, la cromatografía de gases es probablemente la técnica de más amplia utilización; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. Por otra parte, el hecho de que con esta técnica las mezclas sean separadas en fases gaseosas, establece los límites de su utilización, que estarán marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica del compuesto a separar. Por lo general, la utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400 °C; dentro de estos límites, como ya se ha mencionado, la única limitación existente será la estabilidad térmica de la muestra (Gaitan *et al.*, 2011).

La cromatografía de gases tiene sus orígenes en 1951 y consiste en pasar una fase móvil gaseosa por una columna con el fin de separar los componentes volátiles y semi-volátiles de una muestra. Esta es una de las técnicas más utilizadas en laboratorios alrededor del mundo. Pero a pesar de la efectividad de esta técnica, tiene ciertas limitaciones que no se presentan en la cromatografía líquida. Es así como los compuestos poco volátiles, los sensibles a una elevación en temperatura y los que se encuentran en forma iónica, no pueden ser sometidos a esta técnica (García, 2017).

El uso más común de la cromatografía de gases es la determinación de la presencia o ausencia de un compuesto específico en una muestra determinada y esto se realiza mediante la comparación del cromatograma de la sustancia pura versus el de la muestra original. La principal dificultad de esta comparación radica en que pueden haber distintos compuestos que presenten el mismo comportamiento cromatográfico bajo condiciones idénticas. Es por esto que, para evitar conclusiones erróneas, se debe combinar la cromatografía con la espectroscopía de masas como técnicas acopladas (Gutiérrez Bouzán y Droguet, 2017).

La forma de llevar a cabo esta técnica comienza inyectando la muestra en la fase móvil, la cual generalmente es un gas inerte como el helio. En esta primera etapa, los componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria, la cual está fijada en una columna, siendo más comunes las columnas capilares. Esta columna se ubica dentro de un horno. La velocidad de migración de cada componente y su tiempo de permanencia en la columna serán función de su paso desde esta primera fase a la fase estacionaria. La afinidad de cada soluto de la muestra con esta fase permitirá su separación en bandas que pueden posteriormente analizarse (Gutiérrez Bouzán y Droguet, 2017).

Finalmente la cromatografía de gases con espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más completas y es utilizada en investigación, análisis de procesos industriales y en control de calidad. Las principales cualidades de la espectrometría de masas son la capacidad de identificación casi inequívoca, es universal y específica, permite medir la concentración de sustancias, proporciona información estructural de las moléculas y es una técnica rápida que se puede realizar en décimas de segundos, por lo que entrega información en tiempo real. La combinación de estas dos técnicas permite la separación de mezclas muy complejas, detectando y cuantificando todos los componentes individuales de una muestra (García, 2017).

4.6.2 Descripción del Cromatógrafo de Gases

Un cromatógrafo de gases consiste en varios módulos básicos ensamblados para: 1) proporcionar un gasto o flujo constante del gas transportador (fase móvil), 2) permitir la introducción de vapores de la muestra en la corriente de gas que fluye, 3) contener la longitud apropiada de fase estacionaria, 4) mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura), 5) detectar los componentes de la muestra conforme e luyen de la columna, y 6) proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente (Berzosa, 2008).

V. MATERIALES Y EQUIPO

5.1 Descripción del lugar donde se desarrollará la investigación.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad Estatal de Luisiana (LSU) ubicada en la ciudad de Baton Rouge, estado de Luisiana, Estados Unidos. LSU cuenta con laboratorios especializados para esta investigación en su departamento de Ciencias de Alimentos, que pertenece al centro de Agricultura de la Universidad.

5.2 Material vegetal

Se recolectó aleatoriamente muestras frescas del hongo choro (*Amanita Caesarea*) en estado silvestre con madurez óptima en el Municipio La Esperanza, Departamento de Intibucá (Honduras), entre mayo y junio del 2022. La cantidad total de las muestras a recolectadas, se tuvo que realizar una separación manual de las partes no deseadas del hongo. Las muestras procesadas se tuvieron que conservar a temperatura ambiente ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta llegar al proceso de extracción.

5.3 Ensayo de actividad de captación de radicales y polifenoles totales

100 mg ($\pm 0,5$ mg) liofilizados *Amanita Caesarea* molidos con mortero que se liofilizó a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas y se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml. La extracción se aplicó usando 10 ml de metanol al 80 %, seguido de vértice (1 min), sonicación (15 min) y centrifugación (a 1230 g durante 5 min) de la solución para una mejor extracción de los

compuestos de las paredes celulares de la planta. . El procedimiento fue esbozado por Swain & Hillis, 1959, que se utilizó con ligeras modificaciones.

Los Compuestos Fenólicos Totales (TPC) se midieron mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu y una técnica colorimétrica. En un tubo de ensayo de 25 mL se agregaron precisamente 0,5 mL de sobrenadante junto con 8 mL de agua megapura (Barnstead MP-12A, Haverhill, MA) y 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se mezcló 1 mL de bicarbonato de sodio 1 N (Na_2CO_3) después de 3 minutos y la solución (0,5 mg/mL) se mantuvo durante 2 horas a temperatura ambiente (alrededor de 22 °C). Se usó un espectrofotómetro Lambda 35 UV/Vis (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT) para probar la absorbancia del complejo azul a 750 nm. El estándar fue ácido gálico y se logró un gráfico de calibración de ácido gálico (rango de concentración: 50–300 g/mL). El contenido fenólico total se calculó como mg de ácido gálico equivalente/g de peso seco (mg GAE/g).

Con algunos ajustes menores, la técnica de Brand-Williams et al., 1995 se utilizó para evaluar el potencial antioxidante. Los radicales libres se generaron utilizando el compuesto DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidrazilo) que se utilizó para generar radicales libres (Ibragic et al., 2021). Cuando los radicales libres son reducidos por un antioxidante, su absorción a 517 nm se desvanece. Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico) se utilizó como agente antioxidante de referencia en esta investigación. Se disolvieron 0,1 ml de muestras de cultivo de tejido con 0,4 ml adicionales de metanol al 80 % y se transfirieron a un tubo de centrífuga de 1,5 ml añadiendo 0,5 ml de solución de DPPH fresca (0,01577 g/100 ml) que se preparó con metanol al 80 %. La mezcla resultante se agitó en la oscuridad durante 2 minutos antes de incubarla a temperatura ambiente durante 30 minutos en un lugar oscuro, se determinó el porcentaje de supresión de DPPH a partir de la reducción de la absorción.

$$I\% = (\text{absorbancia en blanco} - \text{absorbancia de la muestra}) / (\text{absorbancia en blanco}) \times 100 \quad (1)$$

Se usó un espectrofotómetro Lambda 35 UV/Vis para detectar la reducción en la absorción de DPPH a 517 nm (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT). En el experimento controlado, los extractos SM, DM y AC se sustituyeron por metanol al 80% y también se empleó una

mezcla de metanol al 80% sin DPPH. El potencial antioxidante se determinó utilizando una calibración de referencia creada con dosis específicas de Trolox.

5.4 Diseño de experimentos

Los recursos alimenticios *Amanita Caesarea* fueron examinados por su capacidad para actuar como antioxidantes, así como su contenido total de fenoles, carotenoides, azúcar y ácidos orgánicos. Las características de viabilidad y la resistencia bacteriana con los efectos sinérgicos del material vegetal se examinaron aplicando situaciones de estrés como ácido, bilis, lisozima, jugos gástricos y actividad de proteasa aplicada en ST-M5 y LB-12 (Chr. Hansen, Milwaukee, WI) y se midieron por separado usando agar M17 y agar MRS. La especie investigada se colocó al 2% (p/p). Se aplicaron diferentes pruebas de estrés incluyendo pH 2, sal de buey (0,3%), lisozima (100 mg/L) y jugo gástrico (pepsina (0,32%) y NaCl (0,2%) para comparar cada prueba, junto con un control que es no apareado con materiales vegetales. Se aplicaron los recuentos en placa para evaluar la viabilidad. Todas las pruebas de validación se registraron en cultivos iniciadores de agar MRS y agar MR17 respectivamente para LB y ST y todos los experimentos se repitieron por triplicado con lecturas duplicadas.

5.5 Contenido total de carotenoides

Los carotenoides y sus ésteres se han extraído de forma convencional de liofilizados mediante la *Amaita Caesarea*, el proceso descrito con pequeñas modificaciones Cano et al., 2019. Para comenzar, se combinó 1 g del material liofilizado con 0,5 g de magnesio. Carbonato 50 μ L de (all-E)- β -apo-8'-carotenal (0,40 mg/mL). Posteriormente, para la extracción se aplicaron 20 mL de tetrahidrofurano (THF) fijado con butilhidroxitolueno (BHT) al 0,1% (p/v). La mezcla se mezcló y homogeneizó en un Omnimixer (OMNI Macro S®, OMNI International, Kennesaw, GA, EE. UU.) a 3000 g durante 3 minutos antes de colocarla en un baño de

ultrasonidos (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España) a 50/ 60 Hz y 360 W durante 30 minutos. El extracto centrifugado (a 15 000 g durante 10 minutos a 4 °C) se usó para recolectar el sobrenadante y se mezclaron 20 mL de acetona en el precipitado y la muestra se extrajo 3 veces (el sobrenadante se mezcló usando 20 mL de éter dietílico al final para llegar a gránulos incoloros). Cada vez que surgía una emulsión, se mezclaban con la solución 20 ml de agua saturada que contenía NaCl al 30 % (p/v).

La fase orgánica se recuperó y se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente con 2,5 g de sulfato de sodio anhidro. La muestra se limpió y filtró utilizando papel de filtro Whatman No. 1, y el sobrenadante limpio se secó al vacío a 30 °C en un evaporador rotatorio. Luego, el extracto se diluyó a 2 ml con MeOH/MTBE/H₂O (45,5:52,5:2, v/v/v) y se purificó a través de un filtro de 0,45 µm. Minimizar la isomerización y el deterioro de los carotenoides. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis para medir la concentración total de carotenoides a 450 nm (Specord 210 Plus, Analytik Jena). Después del proceso de separación de carotenoides, se cuantificó el volumen de los extractos de aceite de carotenoides, se determinó la absorbancia y se utilizó hexano como referencia.

En condiciones de poca luz, se examinaron las mezclas de hexano. El contenido total de carotenoides (g de carotenoides/g de aceite vegetal) se estimó utilizando la ecuación (2).

$$\text{Contenido total de carotenoides } (\mu\text{g/g}) = ((A \times V) / (E1\%1\text{cm} \times P \times 100)) \times 10^6 \quad (2)$$

donde A es la absorción a 450 nm, V es el volumen total de absorción (mL), E1%1cm es el coeficiente de absorción de los carotenoides mezclados en hexano ($\xi = 2500 \text{ dL/g cm}$, (Meléndez-Martínez et al. , 2007)), y P es la cantidad de tejido vegetal extraído (g).

5.6 Determinación por HPLC de azúcares y ácidos orgánicos

5.6 1 Preparación de patrones y muestras

Se prepararon homogéneamente 100 mg de cada uno de fructosa, maltosa, glucosa y sacarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en etanol al 80 %, hirviendo, filtrando y completando hasta 10 ml con etanol al 80 % (1 %) usando matraz aforado y filtrado antes de inyectar en el HPLC. Los estándares ayudan a generar una curva de calibración (Jalaludin y Kim, 2021). Para la preparación de los extractos, 10 g de polvo de SM, DM y AC se mezclaron y homogeneizaron en etanol al 80 % utilizando un homogeneizador Vitris 45 durante 1 minuto. Las soluciones producidas se hirvieron durante 15 min y se filtraron utilizando un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,2 μm (Whatman™ Puradisc, Buckinghamshire, Reino Unido).

5.6.2 Operación HPLC

Para la determinación de azúcares, los cromatógrafos de líquidos Beckman serie 340 equipados con una bomba modelo 112, un inyector modelo 210 conectado con un bucle de muestra de 20 μL y un sensor de índice de refracción modelo 156. Un diámetro interior de 300 mm $\times$ 7,8 mm. Se usó una columna recubierta con resina Aminex HPX-87C y calentada a 75 °C para extraer azúcares. En el modo estándar externo utilizando una atenuación de 16 y una velocidad de gráfico de 0,5 cm/min, la señal del detector se combinó electrónicamente mediante un integrador Varian 401. Se insertaron entre ambos un filtro de admisión de columna Rheadyne 7302 de 2 μm , una cápsula de retención de exclusión de iones de 40 x 4,6 mm equipada con resina Aminex HPX-85H y un cartucho protector de aniones/OH de 40 x 4,6 mm empaquetado con resina Aminex A-25. El inyector y la columna analítica. La fase móvil fue de grado HPLC a una velocidad de fluido de 1,2 ml/min (PICHA, 1985).

5.6.3 Estándares de ácidos orgánicos

Se utilizó un patrón al 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) de cualquier ácido orgánico (cítrico, tartárico, L-málico, quínico y succínico) según Zeppa et al. (2001) con algunas modificaciones. El aumento de temperatura no afectó a los ácidos orgánicos en comparación con los valores sin hervir diluidos en etanol al 80%. Se utilizó el mismo modelo de HPLC, la misma columna (modelo de HPLC de azúcar) y un sensor UV Modelo 160 con una frecuencia especificada de 214 nm para la medición de ácidos orgánicos. El sensor se ajustó a 0,100 AU y la curva de calibración del pulso se combinó eléctricamente en el modo de calibración externa mediante un integrador Vista 401 (Varan Assoc., Sunnyvale, CA) con una atenuación de 4 y una velocidad de gráfico de 0,5 cm/ mín. Se insertaron entre el inyector y la columna (Bio-Rad Laboratories) un filtro de entrada de columna Rheodyne modelo 7302 de 2 μ £ (Rheodyne, Cotati, CA) y una cápsula de filtro de exclusión de iones de 40 x 4,6 mm rellena con resina Aminex HPX-85H. El fluido H₂SO₄ 0,0008 N desgasificado se preparó disolviendo una concentración de ácido sulfúrico a nivel químico en una solución de grado HPLC como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min.

5.7 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados utilizando el Modelo Lineal General (PROC GLM) de los Sistemas de Análisis Estadístico (SAS). Se utilizaron diferencias de medias de mínimos cuadrados para determinar diferencias significativas a $P < 0,05$ para el efecto principal (ingredientes frente a control). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de las medias. Se determinaron diferencias significativas a $\alpha = 0,05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Actividad antioxidante

La Tabla 2 indica los resultados de TPC, TCC y actividad antioxidante de las fuentes vegetales SM y AC para comparar su capacidad antioxidante. AC fue bajo en contenido de TPC, actividad antioxidante y TCC ($45.09 \pm 2.65 \mu\text{g GAE/mL}$, $14.43 \pm 1.02\%$, $3.04 \pm 0.21 \text{ mg Q/mL}$ respectivamente).

Tabla 2. Contenido de fenoles totales, contenido de carotenoides totales y actividad antioxidante de diferentes plantas.

Fuentes vegetales	TPC ($\mu\text{g GAE/mL}$)	TCC (mg Q/mL)	Actividad antioxidante (%)
SM	633.22 ± 10.67^a	7.65 ± 0.32^a	41.56 ± 2.77^a
AC	45.09 ± 2.65^b	3.04 ± 0.21^b	14.43 ± 1.02

Medias con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas a $P < 0,05$. SM=*Solanum mammosum*, y AC=*Amanita caesarea*.

6.2 Perfil de ácidos orgánicos

Tablas 3 y 4. Muestran contenido importante de azúcares y ácidos (g/100g) de fuentes vegetales AC. SM tuvo la mayor cantidad de sacarosa y fructosa ($3,04 \pm 0,36$ y $0,27 \pm 0,04$ g/100g respectivamente) en comparación con AC. Además, la maltosa no se detectó significativamente en SM y AC. AC no tenían cantidades significativamente diferentes ($P > 0,05$) de sacarosa, fructosa y glucosa. Las cantidades de glucosa en AC son más altas en

comparación con SM tuvo la mayor cantidad de glucosa ($0,27 \pm 0,03$ g/100 g). La única fuente en la que se detectó maltosa es la SM ($1,37 \pm 0,19$ g/100g).

Fuentes vegetales Cítricos

(g /100g) Tartárico

(g /100g) L-Málico

(g /100g) quínica

(g /100g) Succínico

(g/100g)

Tabla 3. Perfil de azúcar de fuentes vegetales SM y AC.

Fuentes vegetales	Sacarosa (g /100g)	Fructosa (g /100g)	Glucosa (g /100g)	Maltosa (g /100g)
SM	3.04 ± 0.36^a	0.27 ± 0.04^a	0.10 ± 0.03^b	Not detected
AC	0.06 ± 0.02^b	0.10 ± 0.03^b	0.22 ± 0.04^a	Not detected

Medias con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas a $P < 0,05$. SM=*Solanum mammosum*, y AC=*Amanita caesarea*.

La SM fue significativamente más alta ($P < 0,05$) en ácido cítrico ($1,07 \pm 0,13$ g/100g) y baja en L-málico y quínico ($0,38 \pm 0,05$ y $0,48 \pm 0,06$ g/100g) en comparación con otras fuentes.

Tabla 4. Perfil de ácidos orgánicos de diferentes plantas.

Fuentes vegetales	Citrico (g /100g)	Tartarico (g /100g)	L- Malico (g /100g)	Quinica (g /100g)	Succinico (g /100g)
SM	1.07 ± 0.13^a	0.09 ± 0.01^a	0.38 ± 0.05^b	0.48 ± 0.06^b	0.40 ± 0.04^a
AC	0.04 ± 0.01^b	0.02 ± 0.00^b	0.88 ± 0.07^a	1.79 ± 0.10^a	0.05 ± 0.01^b

Medias con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas a $P < 0,05$. SM=*Solanum mammosum*, y AC=*Amanita caesarea*.

VII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el perfil de ácidos orgánicos de la harina de choro mediante métodos espectrofotométricos.
- Se identificó el perfil de azúcares de la harina de choro (*Amanita caesarea*) a través de las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución HPLC.
- Se identificó los compuestos bioactivos de la harina de choro mediante programas Scifinder y Pubchem.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios preliminares para determinar el contenido de vitaminas, minerales y ácidos grasos en la harina de choro.
- Implementar la harina de choro para fortificar la mala nutrición en otros alimentos.
- Hacer análisis sensoriales de un platillo de choro, preparado de diferentes maneras y conocer su aceptabilidad.
- Hacer evaluaciones para obtener un potencial ingrediente funcional a partir del choro.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Fuentes J, López L, Borrás I, Navarro M, Segura A, Lozano J, Manuel, Saraiva M, y Pintado M. (2021). “Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds”. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 398 10(2):398. doi: 10.3390/FOODS10020398.
- Aguilar-Støen, y Moe. (2007). “Conservación y manejo de plantas medicinales: distribución de especies silvestres y cultivadas en ocho países”.
- Arbañil, Isaac. (2022). “Choros los hongos de la región de La Esperanza e Intibucá”. Recuperado el 20 de mayo de (2022) (<https://sazonsula.com/aula-culinaria/choros-los-hongos-de-intibuca>).
- Bernabo, Luca, y Sergio Dominelli. (2002). “Fitoesteroles”. Recuperado (<https://www.evidencia.org/index.php/Evidencia/article/view/4915>).
- Berzosa, Sanz. (2008). “Cromatografía: Cromatografía de Gases.” *Universidad Politecnica de Valencia*. Retrieved May 22, (2022) (<https://riunet.upv.es/handle/10251/1514>).
- Conforti F., Menichini F., Formisano C., Rigano, y Piozzi F. D., Senatore F., Arnold N.A. 2009. “Composición química comparativa, eliminación de radicales libres y propiedades citotóxicas de los aceites esenciales de seis especies de *Stachys* de diferentes regiones del Área Mediterránea”. *Food Chemistry* 116:898–905.
- Contreras, Ramon. (2013). “amanita-caesarea @ biologia.laguia2000.com”.
- Cruz, Ivan, y Alma González. (1999). “(PDF) Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios”. *Lacadonia ISSCN 2007-1000* 3:59–65.
- Equipo Editorial. (2019). “0e4475d235284f8c4d869363f0fb69047d98e685 @ www.lifeder.com”. Recuperado (<https://www.lifeder.com/amanita-caesarea/>).
- Gaitan, Yamiel Gutierrez, Migdalia Miranda Miranda, and Adonis Bellos Alarcon. (2011). “(PDF) Caracterización Química Por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas de Dos Extractos Obtenidos de *Phyllanthus Orbicularis* HBK.” Retrieved May 22, 2022 (https://www.researchgate.net/publication/262620765_Caracterizacion_quimica_por_c

romatografia_de_gasesespectrometria_de_masas_de_dos_extractos_obtenidos_de_Phyllanthus_orbicularis_HBK).

Garcia, Erick. (2017). “4-Cromatografia de Gases | PDF | Cromatografía de Gases | Química.” Retrieved May 22, 2022 (<https://es.scribd.com/presentation/366433343/4-Cromatografia-de-Gases>).

Hooper, Lee, y Aedin Cassidy. (2006). “A review of the health care potential of bioactive compounds”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(12):1805–13. doi: 10.1002/JSFA.2599.

Kris-Etherton, Penny M., Kari D. Hecker, Andrea Bonanome, Stacie M. Coval, Amy E. Binkoski, Kirsten F. Hilpert, Amy E. Griel, y Terry D. Etherton. (2002). “Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer”. *The American journal of medicine* 113 Suppl 9B(9 SUPPL. 2):71–88. doi: 10.1016/S0002-9343(01)00995-0.

Martin Domingo, Agustin. (2011). *Apuntes de Mecanica de Fluidos*.

Nastić, Nataša, Isabel Borrás-Linares, Jesús Lozano-Sánchez, Jaroslava Švarc-Gajić, and Antonio Segura-Carretero. (2018). “Optimization of the Extraction of Phytochemicals from Black Mulberry (*Morus Nigra* L.) Leaves.” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 68:282–92. doi: 10.1016/J.JIEC.2018.07.055.

Leyva-Jiménez, Francisco Javier, Jesús Lozano-Sánchez, María de la Luz Cádiz-Gurrea, David Arráez-Román, and Antonio Segura-Carretero. (2019). “Functional Ingredients Based on Nutritional Phenolics. A Case Study against Inflammation: *Lippia* Genus.” *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 1646 11(7):1646. doi: 10.3390/NU11071646.

Leyva-Jiménez, Francisco Javier, Jesús Lozano-Sánchez, Isabel Borrás-Linares, David Arráez-Román, and Antonio Segura-Carretero. (2018). “Comparative Study of Conventional and Pressurized Liquid Extraction for Recovering Bioactive Compounds from *Lippia Citriodora* Leaves.” *Food Research International* 109:213–22. doi: 10.1016/J.FOODRES.2018.04.035.

Pérez-Jiménez, Jara, Jose Serrano, Maria Tabernero, Sara Arranz, M. Elena Díaz-Rubio, Luis García-Diz, Isabel Goñi, y Fulgencio Saura-Calixto. (2008) “Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors.” *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 24(7–8):646–53. doi: 10.1016/J.NUT.2008.03.012.

- Persoon. (1821). “Amanita_caesarea @ hmong.es”. Recuperado (https://hmong.es/wiki/Amanita_caesarea).
- Puri, B. y Hall, A. 1998. “Phytochemical Dictionary | A Handbook of Bioactive Compounds from Plan”. Recuperado el 23 de mayo de (2022) (<https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.4324/9780203483756/phytochemical-dictionary-gerald-moss-harborne-herbert-baxter-basant-puri-anne-hall>).
- Quiñones, M., M. Miguel, y A. Aleixandre. (2012). “Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular”. *Nutr Hosp* 27(1):76–89. doi: 10.3305/nh.2012.27.1.5418.
- Marcía-Fuentes, Jhunion, Ricardo Santos-Aleman, Isabel Borrás-Linares, and Jesús Lozano Sánchez. (2021). “The Carao (Cassia Grandis L.): Its Potential Usage in Pharmacological, Nutritional, and Medicinal Applications.” *Innovations in Biotechnology for a Sustainable Future* 403–27. doi: 10.1007/978-3-030-80108-3_19.
- Marcía Fuentes, Jhunion, Lucía López-Salas, Isabel Borrás-Linares, Miguel Navarro-Alarcón, Antonio Segura-Carretero, Jesús Lozano-Sánchez, Jorge Manuel Alexandre Saraiva, and Manuela Pintado. (2021). “Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds.” *Foods 2021, Vol. 10, Page 398* 10(2):398. doi: 10.3390/FOODS10020398.
- Marcía, Jhunion Abrahan, Lucía López-Salas, Isabel Borrás-Linares, Miguel Navarro-Alarcón, Antonio Segura-Carretero, and Jesús Lozano-Sánchez. (2021). “Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds.” *Foods (Basel, Switzerland)* 10(2):398. doi: 10.3390/FOODS10020398.
- Ríos-Hoyo, Alejandro, María José Cortés, Huguette Ríos-Ontiveros, Eduardo Meaney, Guillermo Ceballos, and Gabriela Gutiérrez-Salmeán. (2015). “Obesity, Metabolic Sarmiento, Elia, y Gustavo Fontecha. 2015. “Conocimiento tradicional de los hongos en el occidente de Honduras”. *Revista Ciencia y Tecnología* 19–29. doi: 10.5377/rct.v0i13.1710.
- Silva, Paola, Victoria Figueroa, y cecilia Baginsky. (2016). “Fuentes naturales de fitoesteroles y factores de producción que lo modifican”. 66(1).

- Singh Nee Nigam, Poonam, Nutan Gupta, y Ashish Anthwal. (2009). “Pre-treatment of agro-Industrial Residues”. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* 13–33. doi: 10.1007/978-1-4020-9942-7_2.
- Suárez, Kátherin, y Ericsson Coy. 2016. “Diversidad de los compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad en el metabolismo secundario”. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 12(2):252–69. doi: 10.18359/rfcb.2031.
- Zhang, Hongxia, John Birch, Zheng Feei Ma, Chaonan Xie, Haiyan Yang, Alaa El Din Bekhit, and George Dias. (2019). “Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from New Zealand and Chinese *Asparagus Officinalis* L. Roots.” *Journal of Food Science and Technology* 2019 56:2 56(2):799–810. doi: 10.1007/S13197-018-3540-0.

ANEXOS

Proceso de estandarización de la harina



Anexo 1. Recolección del material vegetativo



Anexo 2. Pesado



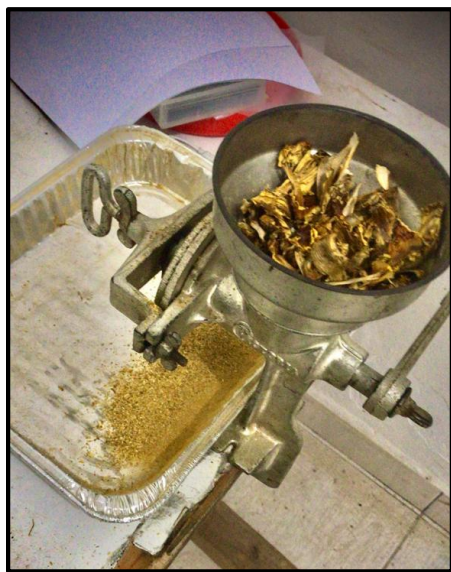
Anexo 3. Medido



Anexo 4. Choro en rejillas



Anexo 5. Deshidratado



Anexo 6. Molido



Anexo 7. Tamizado

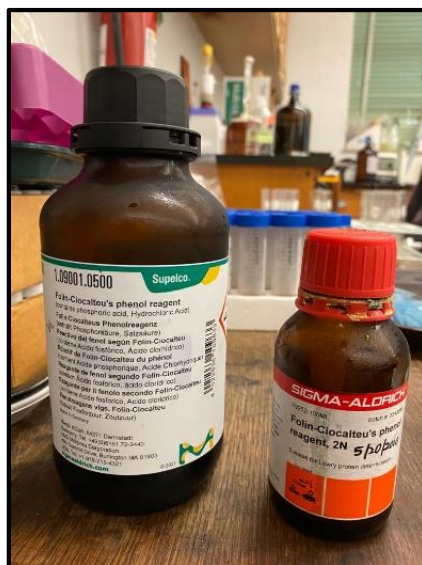


Anexo 8. Producto final

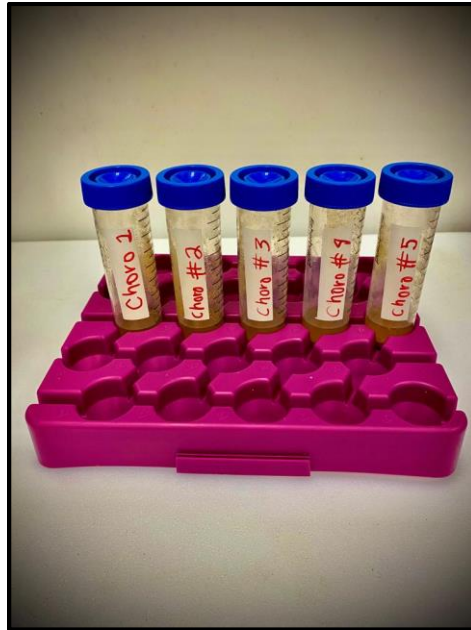
Análisis en el laboratorio



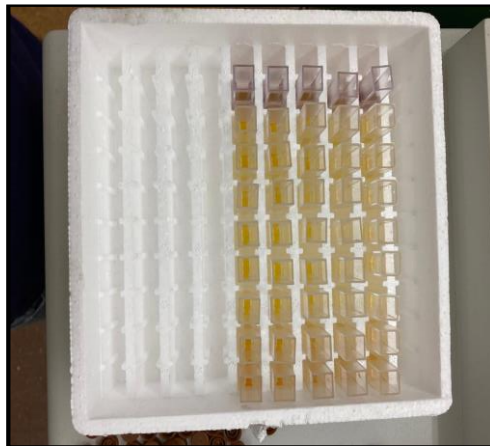
Anexo 9. Equipo



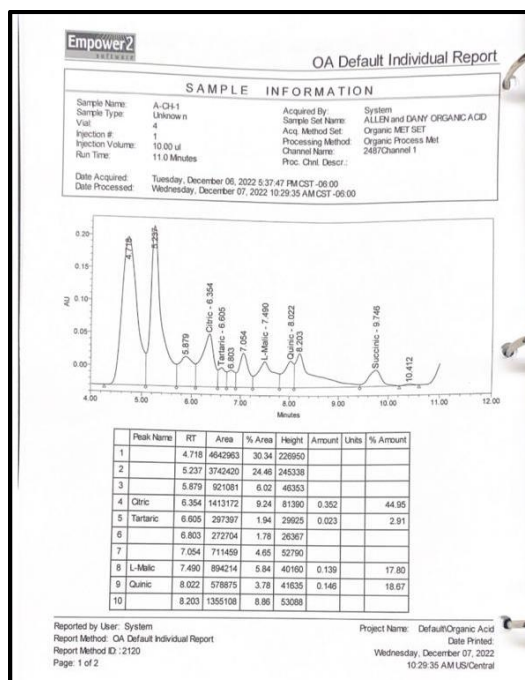
Anexo 10. Reactivos



Anexo 11. Repeticiones



Anexo 12. Muestras diluidas



Anexo 13. Cromatografía