



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR
Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos
Naturales y del Ambiente
Carrera de Ingeniería Agroindustrial

TEMA:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL HONGO SHIITAKE (*Lentinula edodes*), CULTIVADO EN RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

AUTOR:

JORDANI EDUARDO SANABRIA HINOJOZA

DIRECTORA:

Dra. María Bernarda Ruilova Cueva. PhD

Guaranda- Ecuador

Mayo - 2018

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
HONGO SHIITAKE (*Lentinula edodes*), CULTIVADO EN RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS**

REVISADO Y APROBADO POR:

DRA. MARÍA BERNARDA RUILOVA CUEVA PhD.

DIRECTORA

ING. VÍCTOR DANILO MONTERO SILVA Mg.

BIOMETRISTA

ING. SONIA MARÍA DEL CARMEN SALAZAR RAMOS Mg.

REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Jordani Eduardo Sanabria Hinojoza, con CI. 0202384053, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor(es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

JORDANI EDUARDO SANABRIA HINOJOZA

CI 0202384053

DRA. MARÍA BERNARDA RUILOVA CUEVA PhD.

CI 0701189433

DIRECTORA

ING. SONIA MARÍA DEL CARMEN SALAZAR RAMOS Mg.

CI. 0200933067

REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo está dedicado a mis padres Pilar Hinojoza, Abel Sanabria y a mi tía Isabel Hinojoza; que me apoyaron incondicionalmente para culminar con éxito una meta más.

Jordani

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiar mi camino para cumplir otro objetivo en mi vida

A mis padres y tías, que son la razón, fuerza y el motor que me impulsa.

A la Universidad Estatal de Bolívar que me recibió, abriendo sus puertas, siendo parte de esta gran familia, dándome la oportunidad de obtener sus conocimientos.

A mi directora de tesis Dra. María Bernarda Ruilova PhD, así como también al Ing. Víctor Danilo Montero Silva Mg e Ing. Sonia Salazar Ramos Mg por la dirección, dedicación, paciencia y por entregarme sus conocimientos impartidos que me han permitido terminar con éxito esta investigación.

Jordani

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	Pág.
TEMA	I
CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
RESUMEN.....	XIV
SUMMARY	XV
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
CAPÍTULO II	4
PROBLEMA	4
CAPÍTULO III.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
3.1. Generalidades de los hongos	6
3.2. Hongo <i>Lentinula edodes</i>	7
3.2.1. Clasificación Científica.....	8
3.2.2. Morfología (<i>L. edodes</i>).....	8
3.2.3. Ciclo de reproducción	10
3.3. Valor nutricional del <i>Lentinula edodes</i>.....	11
3.4. Componentes bioactivos del <i>Lentinula edodes</i>	14
3.5. Propiedades medicinales del <i>Lentinula edodes</i>	18
3.5.1. Propiedades antitumorales y anticancerígenas.....	20
3.5.2. Actividad antiviral.....	20
3.5.3. Actividad cardiovascular y hipocolesterolémica	21
3.5.4. Propiedades antihipertensivas	22
3.5.5. Actividad antioxidante	23

3.6. Propiedades antimicrobianas de los Hongos Basidiomicetos.....	24
3.6.1. Actividad antimicrobiana del hongo <i>Lentinula edodes</i>	26
3.7. Extractos Vegetales y Fúngicos.....	31
3.7.1. Método de extracción por Maceración.....	32
3.7.2. Método de extracción Soxhlet.....	32
3.7.3. Método de extracción por Hidrodestilación.....	33
3.7.4. Método de extracción por Fluidos Supercríticos	33
3.8. Bacterias.....	34
3.8.1. Bacterias patógenas en los alimentos.....	35
3.8.1.1. <i>Listeria spp</i>	36
3.8.1.2. <i>Salmonella spp.</i>	37
3.8.1.3. <i>Escherichia Coli</i>	38
3.8.2. Mecanismo de acción de los antibacterianos	39
3.8.3. El Antibiograma de discos, técnica de Kirby-Bauer.....	41
CAPÍTULO IV	44
MARCO METODOLÓGICO	44
4.1. Ubicación del experimento	44
4.2. Situación geográfica y climática de la localidad.....	44
4.2.1. Zona de vida.....	45
4.3. Materiales.....	45
4.3.1. Material experimental	45
4.3.2. Reactivos	45
4.3.3. Equipos y materiales	45
4.3.4. Material de laboratorio	46
4.3.5. Materiales de oficina	46
4.4. Métodos	47
4.4.1. Factores de estudio.....	47
4.4.2. Esquema del experimento	47
4.4.3. Características del experimento	48
4.4.4. Tipo de diseño experimental	48
4.4.5. Análisis Estadísticos	48
4.5. Mediciones experimentales.....	49

4.5.1. En la materia prima	49
4.5.2. En los extractos del <i>Lentinula edodes</i> (píleo y estipe).....	50
4.6. Manejo del Experimento	51
4.6.1. Siembra y recolección de hongos.....	51
4.6.2. Obtención de Extractos	51
4.6.3. Preparación del Inoculo.....	53
4.6.4. Antibiograma de Disco (técnica de Kirby-Bauer)	53
4.6.4.1. Preparación de los discos para realizar el antibiograma	54
4.6.4.2. Inoculación e incubación de la muestra	54
4.6.4.3. Medición de los halos de inhibición	54
CAPÍTULO V.....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1. Caracterización de la composición físico-química del hongo <i>Lentinula edodes</i>.....	55
5.1.1. Obtención de extractos del hongo utilizando diferentes solventes	56
5.1.1.1. Volumen final de los extractos utilizando diferentes disolventes .	56
5.1.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del hongo <i>Lentinula edodes</i> , mediante la técnica de Kirby-Bauer frente a bacterias patógenas (<i>E. coli</i> , <i>salmonella spp</i> y <i>listeria spp</i>).	59
5.1.2.1. Sensibilidad de los extractos obtenidos a partir del hongo <i>Lentinula edodes</i> frente a <i>listeria spp</i>	60
5.1.2.2. Sensibilidad de los extractos obtenidos a partir del hongo <i>Lentinula edodes</i> frente a <i>Salmonella spp</i>	63
5.1.2.3. Sensibilidad de los extractos obtenidos a partir del hongo <i>Lentinula edodes</i> frente a <i>Escherichia coli</i>	66
CAPÍTULO VI.....	70
COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS	70
6.1. Hipótesis.....	70
6.2. Análisis de comprobación de la hipótesis.....	70
CAPÍTULO VII.....	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
7.1. Conclusiones	71

7.2. Recomendaciones	72
BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	DESCRIPCIÓN	Pág.
1.	Clasificación taxonómica del hongo <i>Lentinula edodes</i>	8
2.	Composición proximal y nutricional del píleo y estipe del <i>Lentinula edodes</i> en 100g (base seca)	12
3.	Concentración de vitaminas de la seta del <i>L. edodes</i> en 100.....	12
4.	Composición de aminoácidos esenciales de la seta <i>L. edodes</i>	13
5.	Composición de ácidos grasos del <i>L. edodes</i>	13
6.	Efectos terapéuticos y compuestos bioactivos de los extractos del <i>L. edodes</i> ...	19
7.	Estudios de actividad antimicrobiana del <i>Lentinula edodes</i>	27
8.	Diámetros (mm) de zona de inhibición producida en una amplia gama de microorganismos frente a los extractos de <i>L. edodes</i> y <i>P. ostreatus</i>	30
9.	Mecanismo de acción de antibacterianos y su clasificación de acuerdo a su estructura química.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	DESCRIPCIÓN	Pág.
1.	Localización de la investigación.....	44
2.	Situación geográfica y climática	44
3.	Factores de estudio en la investigación	47
4.	Esquema del experimento, descripción de las combinaciones A x B.....	47
5.	Análisis de varianza para el Diseño de Bloques Completamente al Azar.....	49
6.	Valores promedios y desviación estándar de la composición de las partes representativas del <i>L. edodes</i> en base seca.....	55
7.	Media del volumen (mL) de los extractos obtenidos en los diferentes tratamientos.....	57
8.	Análisis de varianza (ADEVA) para volumen de los extractos del hongo.....	57
9.	Prueba de Tukey al 5% de las medidas de los tratamientos volumen de los extractos.....	58
10.	Medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana de los extractos del hongo frente a la bacteria <i>Listeria spp.</i>	60
11.	Análisis de varianza (ADEVA) para los resultados experimentales del diámetro de los halos de inhibición de los extractos en el crecimiento de <i>Listeria spp.</i>	60
12.	Comparación según Tukey al 5% de las medidas de los tratamientos de la variable medición de halos de inhibición de <i>Listeria</i>	61
13.	Medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana de los extractos del hongo frente a la bacteria <i>Salmonella spp.</i>	63
14.	Análisis de varianza (ADEVA) para los resultados experimentales de halos de inhibición de los extractos en el crecimiento de <i>Salmonella spp.</i>	64
15.	Comparación según Tukey al 5% de las medidas de los tratamientos de la variable medición de halos de inhibición de <i>Salmonella</i>	64
16.	Medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana de los extractos del hongo frente a la bacteria <i>E. coli</i>	66

17. Análisis de varianza (ADEVA) para los resultados experimentales de halos de inhibición de los extractos en el crecimiento de <i>E. coli</i> .	67
18. Comparación según Tukey al 5% de las medidas de los tratamientos de la variable medición de halos de inhibición de <i>E. coli</i>	67
19. Resumen de la sensibilidad de las bacterias a los extractos del <i>Lentinula edodes</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	DESCRIPCIÓN	Pág.
1.	Estructura típica de un hongo basidiomiceto <i>L. edodes</i>	9
2.	Aspecto del Shiitake.....	10
3.	Reproducción de hongos basidiomicetes del género <i>Lentinula</i>	11
4.	Estructura química de Lentinán.....	14
5.	Estructura química de la Eritadenina.....	16
6.	Importancia medicinal del <i>Lentinula edodes</i>	18
7.	<i>Listeria</i> en caja de Petri y vista desde el microscopio óptico.....	36
8.	<i>Listeria</i> vista desde el microscopio óptico.....	36
9.	<i>Salmonella</i> en caja de Petri y vista desde el microscopio óptico.....	37
10.	<i>Salmonella</i> vista desde el microscopio óptico.....	37
11.	<i>Escherichia coli</i> en caja de Petri.....	38
12.	<i>Escherichia coli</i> vista desde el microscopio óptico.....	38
13.	Antibiograma por difusión con discos en el que se observa la presencia de halos de inhibición.....	43
14.	Diagrama de flujo de la elaboración de extractos a partir del <i>L. edodes</i>	52
15.	Composición físico-química del píleo y estipe del hongo <i>Lentinula edodes</i>	56
16.	Medias del volumen de los extractos.....	59
17.	Medias de la medida de los halos de inhibición de los tratamientos con diferentes extractos frente a <i>Listeria spp</i>	62
18.	Medias de los halos de inhibición de los tratamientos para <i>Salmonella spp</i>	65
19.	Medias de los halos de inhibición de los tratamientos para <i>E. Coli</i>	68

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°	DESCRIPCIÓN
1.	Mapa de ubicación de la investigación
2.	Resultados de Análisis físico químicos
3.	Bases de datos
4.	Fotografías
5.	Glosario de términos

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antimicrobiana del hongo shiitake (*Lentinula edodes*), cultivado en residuos lignocelulósicos, estableciendo como factores de estudio: las partes de la seta del *Lentinula edodes* (píleo y estipe), y tipos de disolvente (cloroformo, etanol, acetato de etilo, agua + etanol 50 %). Los setas cultivadas sobre residuos lignocelulósicos, se cosecharon, se deshidrataron a temperatura ambiente y se dividieron en píleo y estipe, estas se analizaron por separado, presentaron variaciones entre sí en el contenido de humedad la cual varió muy poco, el contenido de cenizas para el estipe fue mucho mayor (7.9 g/100g). El contenido de proteínas fue mayor para el píleo (24.2 g/100g), mientras que la fibra fue mayor para el estipe (22.8 g/100g). El contenido de grasa en el hongo *Lentinula edodes* fue muy bajo (< 3 %). Del estipe y píleo del hongo pulverizado se obtuvieron extractos utilizando cuatro diferentes disolventes, el extracto que tuvo mayor rendimiento fue el T1 (67 mL) que corresponde al estipe + cloroformo, sin embargo la extracción con etanol en el estipe del hongo fue el proceso más eficiente debido a que los extractos etanólicos del estipe obtuvieron los mayores halos de inhibición frente a las tres bacterias patógenas. El etanol retuvo de mejor manera los agentes bioactivos del estipe del hongo *Lentinula edodes*. La eficiencia antimicrobiana de los extractos del hongo fue probada sobre bacterias patógenas, obteniéndose que el tratamiento T2 (estipe + etanol) presentó mejores resultados en la técnica antibiograma de discos-placa inhibiendo el crecimiento de las bacterias: *Listeria spp* (Gram positiva) con un halo de inhibición de 12.7 mm, *Salmonella spp* (Gram negativa) con un halo de inhibición de 9.3 mm y *Escherichia coli* (Gram negativa) con un halo de inhibición de 8 mm.

Palabras claves: Actividad antimicrobiana, píleo, estipe, solventes orgánicos, inhibición del crecimiento bacteriano.

SUMMARY

The objective of the present investigation was to determine the antimicrobial activity of the shiitake fungus (*Lentinula edodes*), cultivated in lignocellulosic residues, establishing as factors of study: the parts of the mushroom of the *Lentinula edodes* (pileus and stipe), and types of solvent (chloroform, ethanol, acetate style, water + 50% ethanol). Mushrooms grown on lignocellulosic residues, were harvested, dehydrated at room temperature and divided into pileus and stipe, these were analyzed separately, they showed variations among themselves in the moisture content which varied very little, the ash content for the Stipe was much larger (7.9 g / 100g). The protein content was higher for the pileus (24.2 g / 100g), while the fiber was higher for the stipe (22.8 g / 100g). The fat content in the fungus *Lentinula edodes* was very low (<3%). From the stipe and pileus of the pulverized fungus extracts were obtained using four different solvents, the extract that had the highest yield was T1 (67 mL) corresponding to the stipe + chloroform, however the extraction with ethanol in the stipe of the fungus was the most efficient process because the Ethanoic extracts of the stipe obtained the highest inhibition zones against the three pathogenic bacteria. Ethanol better retained the bioactive agents of the fungus spindle *Lentinula edodes*. The antimicrobial efficiency of the extracts of the fungus was tested on pathogenic bacteria, obtaining that the T2 treatment (stipe + ethanol) presented better results in the plate-plate antibiogram technique inhibiting the growth of the bacteria: *Listeria spp* (Gram positive) with a inhibition halo of 12.7 mm, *Salmonella spp* (Gram negative) with a halo of inhibition of 9.3 mm and *Escherichia coli* (Gram negative) with a halo of inhibition of 8.0 mm.

Keywords: Antimicrobial activity, pileus, stipe, organic solvents, inhibition of bacterial growth.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El consumo de hongos comestibles y medicinales ha sido una práctica común desde hace miles de años en la cultura oriental (Suárez y Nieto 2013), aunque se sabía de sus propiedades para mantener y mejorar la salud, solo hasta hace unos pocos años estudios científicos han verificado esta información (Miles y Chang 2004). Desde el punto de vista medicinal un amplio número de hongos, entre 270 a 700 especies, han mostrado propiedades bioactivas y farmacológicas (Smith et al. 2002, Chang 2008).

Los compuestos naturales con actividad biológica están normalmente presentes en plantas, hongos y varias otras fuentes. Resulta muy importante el uso de técnicas de extracción para obtener sustancias con propiedades bioactivas (Spigno y De Faveri 2007). Para la producción de compuestos de interés farmacológico a partir de hongos medicinales, generalmente se utiliza los la seta entera, el píleo, el estipe o el micelio del hongo en estado fresco o deshidratado. Estos compuestos se obtienen por contacto con solventes adecuados a través de técnicas de extracción como: maceración, percolación, destilación entre otros, los extractos obtenidos son utilizados para la elaboración de una gran variedad de derivados farmacológicos. Actualmente entre el 80 y 85 % de todos los productos medicinales de los hongos, son obtenidos de sus cuerpos fructíferos producidos comercialmente o colectados de hongos silvestres (Lindequist et al. 2005).

Las aplicaciones de los extractos y compuestos de hongos incluyen complementos medicinales o suplementos dietéticos, como agentes anticancerígenos, antivirales, inmunopotenciadores, hipocolesterómicos y hepatoprotectores, formando una nueva clase de compuestos llamados nutraceuticos (Chang 2008). Estas características hacen posible el desarrollo de nuevos productos elaborados a base de hongos comestibles (Pérez et al. 2010)

Por otra parte, el surgimiento de resistencia bacteriana por parte de patógenos a múltiples agentes antimicrobianos se ha convertido en una amenaza significativa para la salud pública y seguridad alimentaria ya que hay menos, o incluso no hay, compuestos efectivos disponibles para las infecciones causadas por bacterias. (Magiorakos et al. 2012). La demanda de agentes antimicrobianos de origen natural (derivados de vegetales u hongos) está en aumento (Ding et al. 2015), debido a que han demostrado ser menos tóxicos y libres de efectos secundarios que los agentes sintéticos (Maeda et al. 1974). Estas propiedades han llevado al descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos, por esto en la actualidad se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana (Maeda y Chihara 1973, Gadea et al. 2017).

Dentro de los hongos medicinales, uno de los que resalta es el *Lentinula edodes* es la segunda seta comestible más cultivada y ampliamente utilizado en la industria alimentaria en el mercado mundial (Van Ba et al. 2017). Este hongo tiene un alto valor nutricional y contiene varios compuestos bioactivos, incluyendo polisacáridos, fibra dietética, vitamina B1, B2 y C, folatos, niacina y minerales, además de compuestos como el ergosterol, poli terpenos y polisacáridos que le atribuyen a este hongo propiedades antimicrobianas (Rao et al. 2009, Jiang et al. 2014). Por lo que resulta de mucho interés realizar un estudio para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de este hongo, que le permiten retardar o inhibir completamente el crecimiento de microorganismos patógenos encontrados en productos alimenticios.

Este trabajo investigativo tuvo como objetivo general: Determinar la actividad antimicrobiana del hongo shiitake (*Lentinula edodes*), cultivado en residuos lignocelulósicos y como objetivos específicos los siguientes:

- La caracterización de la composición físico-química (humedad, cenizas, proteína, fibra, grasa) del hongo *Lentinula edodes* cultivado en residuos lignocelulósicos.

- El desarrollo de una metodología para la obtención de extractos del píleo y estipe del hongo cultivado en residuos utilizando diferentes solventes.
- La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes*, mediante la técnica de Kirby-Bauer frente a bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria spp*).

CAPÍTULO II

PROBLEMA

A nivel mundial se realizan importantes investigaciones encaminadas al estudio y aprovechamiento de los componentes bioactivos de plantas, algas y macrohongos y su aplicación en la industria alimentaria, medicina y biotecnología.

La conservación de alimentos ha sido utilizada desde hace varios siglos, sin embargo, con el fin de aumentar la vida útil de los alimentos y conservar sus propiedades, se han utilizado indiscriminadamente aditivos antimicrobianos y anti fúngicos, haciendo que los alimentos contengan altas dosis de químicos, que consumidos frecuentemente puede causar bio-acumulación, induciendo graves enfermedades metabólicas en los consumidores, además las bacterias que son sometidas a este tipo de sustancias pueden adquirir resistencia.

En el hongo *Lentinula edodes* están presentes componentes naturales con propiedades antimicrobianas, por lo tanto, el uso de técnicas de extracción es importante para separar estas sustancias y evaluar su actividad frente a algunos de los principales patógenos (bacterias) que contaminan los alimentos. Esta propuesta es consecuente con la necesidad de buscar otras alternativas para la obtención de antibióticos de origen natural e incentivar la producción y consumo de alimentos saludables que aporten nutricionalmente y actúen haciendo que nuestro sistema inmune funcione correctamente reduciendo el riesgo de contraer enfermedades crónicas no transmisibles.

En la actualidad, el gran desafío para los países en vías de desarrollo, es poder vincular y convertir el conocimiento proveniente de los recursos naturales para el desarrollo de procesos, métodos, compuestos o productos útiles, como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad. En el Ecuador, este tipo de investigaciones se encuentran en desarrollo y no se han publicado trabajos utilizando el hongo *Lentinula edodes*; por

lo que en la presente investigación se determinó la actividad antimicrobiana de distintos extractos del hongo *Lentinula edodes* frente a bacterias patógenas encontrados en los alimentos (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria spp*).

En este sentido se plantea la siguiente pregunta que ayuda a identificar y dar respuesta al problema:

¿LOS EXTRACTOS DEL ESTIPE Y PÍLEO DEL *Lentinula edodes* OBTENIDOS UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES PRESENTARÁN ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria spp*)?

El interés de esta investigación es el aprovechamiento de los extractos del hongo *Lentinula edodes* como una alternativa para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, éste estudio aportará conocimiento sobre las características antibacterianas del *L. edodes*, lo cual constituye un paso preliminar que puede ser ampliado en futuras investigaciones, contribuyendo al desarrollo de la industria farmacológica y agroindustrial.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos sumamente variables y polimorfos, tanto microscópica como macroscópicamente (Barrera et al. 2011). Han sido empleados por el hombre desde hace milenios para la alimentación y el tratamiento de diferentes enfermedades (Suárez y Nieto 2012). Están involucrados en numerosos fenómenos biológicos y químicos vinculados a la desintegración de la materia orgánica, procesos industriales de fermentación, producción comercial de medicamentos y los sistemas de producción alimenticia (Miles y Chang 2004)

Se estima que existen 1.5 millones de especies de hongos y 140 mil corresponden a hongos macroscópicos (Wasser 2002), de estos entre 270 a 700 son de gran importancia ya que en su composición contiene compuestos que se les atribuyen propiedades funcionales (Chang 2008), nutraceuticas, entre otras , ofreciendo un enorme potencial comercial al ser utilizados como materia prima para generar productos benéficos a la salud (Lindequist et al. 2005), crecen sobre materia descompuesta y sustratos lignocelulósicos secretando una mezcla de enzimas hidrolíticas y oxidantes capaces de descomponer la lignina, produciendo la llamada podredumbre blanca (Miles y Chang 2004).

En Japón, por ejemplo, se explota a los hongos considerados medicinales (*Lentinula edodes* y *Ganoderma lucidum*), como base para diversos productos que van desde la producción de hongos en polvo para cosméticos, té, bebidas vigorizantes, hasta extractos para rejuvenecer la piel (Pérez et al. 2010). Los hongos comestibles considerados medicinales como el *Lentinula edodes* y el *Pleurotus ostreatus* poseen un gran valor nutricional, estos son ricos en proteínas (18-30% ps.) (Rodríguez y Jaramillo 2005), contienen carbohidratos, fibra, bajos en grasa y valor energético, son una buena fuente de vitaminas y minerales, apetecibles en la

industria alimentaria por su sabor y aroma, lo que los coloca por arriba de la mayoría de vegetales, frutas y verduras. (Çağlarirmak 2007).

3.2. Hongo *Lentinula edodes*

Es una variedad regional de Asia oriental. También conocido como hongo negro del bosque, esta especie forma parte de los hongos de pudrición blanca, habita de forma natural en la madera muerta de muchas especies de árboles en diversas condiciones climáticas (Villegas et al. 2007), conocido por sus atributos sensoriales, nutricionales y funcionales, es el segundo hongo comestible más cultivado del planeta, antecedido por el champiñón blanco (*Agaricus bisporus*) (Bisen et al. 2010).

El hongo *Lentinula edodes* produce una variedad de enzimas degenerativas extracelulares, incluyendo celulasas, hemicelulasas, fosfatasas, lacasas, peroxidases y ligninasas que contribuyen a la degradación y el reciclaje de la madera en la naturaleza (Regina et al. 2008, Casaril et al. 2011)

En los últimos años, una gran cantidad de estudios han demostrado que el hongo es rico en nutrientes y compuestos con propiedades bioactivas (Zhang et al. 2013), es el primer macrohongo medicinal en entrar en el ámbito de la biotecnología moderna, varios compuestos biológicamente activos se han aislado y purificado a partir de la setas, micelios y extracto acuoso de este hongo (Hasegawa et al. 2005, Bisen et al. 2010).

En cuanto a la estructura, el *Lentinula edodes* consiste en dos partes que son el píleo (sombrero) y estipe (talo) (Zhang et al. 2013). En la industria alimentaria se utiliza y es muy apetecido el píleo del hongo mientras que el estipe, que entre sus componentes contiene alto contenido de fibra cruda insoluble se descarta, generalmente debido a su textura dura (Zhang et al. 2013, Jiang et al. 2014). Los análisis de composición proximal muestran que los dos componentes del hongo son diferentes en su composición química (Jiang et al. 2010), comprobándose que el

estipe del *Lentinula edodes* contiene un valor nutricional superior y mayores concentraciones de compuestos bioactivos que el píleo del hongo (Tseng et al. 2007, Yen y Mau 2007, Zhang et al. 2013)

3.2.1. Clasificación Científica

Pertenece a un orden de los Basidiomicetes denominado Agaricales (Cuadro N° 1), que son los típicos hongos conocidos por su sombrerillo y un tallo falso o pedicelo.

Cuadro N° 1. Clasificación taxonómica del hongo *Lentinula edodes*

Nombre científico	<i>Lentinula edodes</i>
Reino	Fungi
División	Basidiomycota
Clase	Basidiomycetes
Subclase	Agaricomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Lentinula</i>
Especie	<i>Edodes</i>

Fuente: Pleger, 1983

3.2.2. Morfología (*L. edodes*)

En el hongo hay que diferenciar dos partes fundamentales: el cuerpo vegetativo y el cuerpo fructífero (reproductor) (Boa 2005). El cuerpo vegetativo (micelio), se encuentra bajo de la superficie del suelo, de la madera, u otras fuentes de alimento, está formado por unos filamentos llamados hifas (Chang 2008), las cuales se encargan de absorber las sustancias minerales del suelo para alimento del hongo. La seta (a la que vulgarmente se llama hongo), es su aparato reproductor o cuerpo fructífero (Stamets y Chilton 1983, Lopez 2016). La estructura típica de los hongos comestibles basidiomicetes es la presentada en la Figura N° 1

La parte comestible (cuerpo fructífero) del hongo *Lentinula edodes* consiste de dos partes representativas: píleo y de estípite, en una proporción aproximada de 75% y 25% del hongo en base seca respectivamente (Ming et al. 2015). La estructura típica de los hongos comestibles basidiomicetes es la presentada en la Figura N° 1

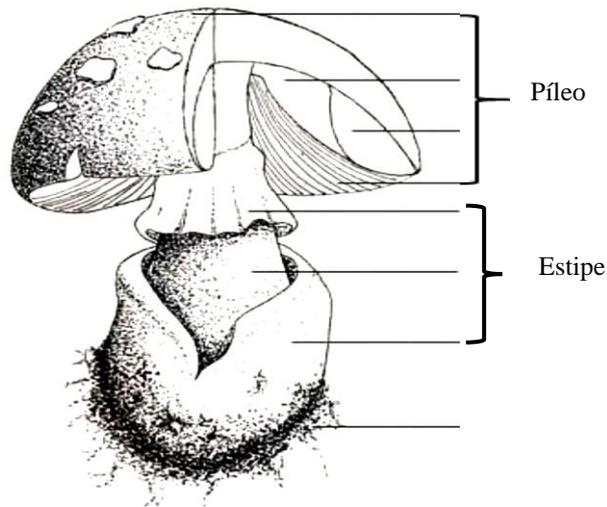


Figura N° 1. Estructura típica de un hongo basidiomiceto *L. edodes*

Fuente: Silva *et al.*, 2010

El Píleo: llamado también sombrero es color café oscuro, pero con el tiempo su color cambia a café claro, como se puede observar en la Figura N° 2, su forma puede ser irregular, normalmente el hongo al principio debe estar un poco enrollado a medida que se desarrolla debe ser encorvado (Stamets 2000), mide aproximadamente de 5 a 25 cm de ancho, su función principal es de protección en la formación y desarrollo de las esporas, es carnoso en estado adulto y suave en especímenes inmaduros (Silva et al. 2010).

Las manchas o pelusa que aparece irregularmente en el sombrero es señal que el hongo ha alcanzado su madurez, inicialmente son puntos de color blanco pero pueden llegar a tornarse de color café cuando el hongo se está deteriorando (Stamets y Chilton 1983)



Figura N° 2. Aspecto del Shiitake

Fuente: Silva *et al.*, 2010

Estípite: Llamado también talo o pie, se encuentra sujetando al himenio y al sombrero, mide de 3 a 5 cm de largo y de 8 a 13 mm de grosor, de superficie delgada envainada por un velo delgado, que termina en la zona apical conforme (Silva et al. 2010).

3.2.3. Ciclo de reproducción

La forma de reproducción de los hongos es por esporas las cuales se dispersan en un estado latente, que se interrumpe sólo cuando se hallan condiciones favorables para su germinación. Los hongos basidiomicetos tienen unas células madre ubicadas en el himenio que son las encargadas de producir las esporas llamados basidios. Cada basidio lleva cuatro esporas con un núcleo haploide (Figura N° 3). Si la espora se deposita en un lugar cuyas condiciones sean favorables la espora germina, surgiendo de ella una primera hifa (Stamets y Chilton 1983, Miles y Chang 2004)

Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas resultante de este crecimiento se llama micelio. Cuando el micelio se desarrolla puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos o carpóforos (Silva et al. 2010).

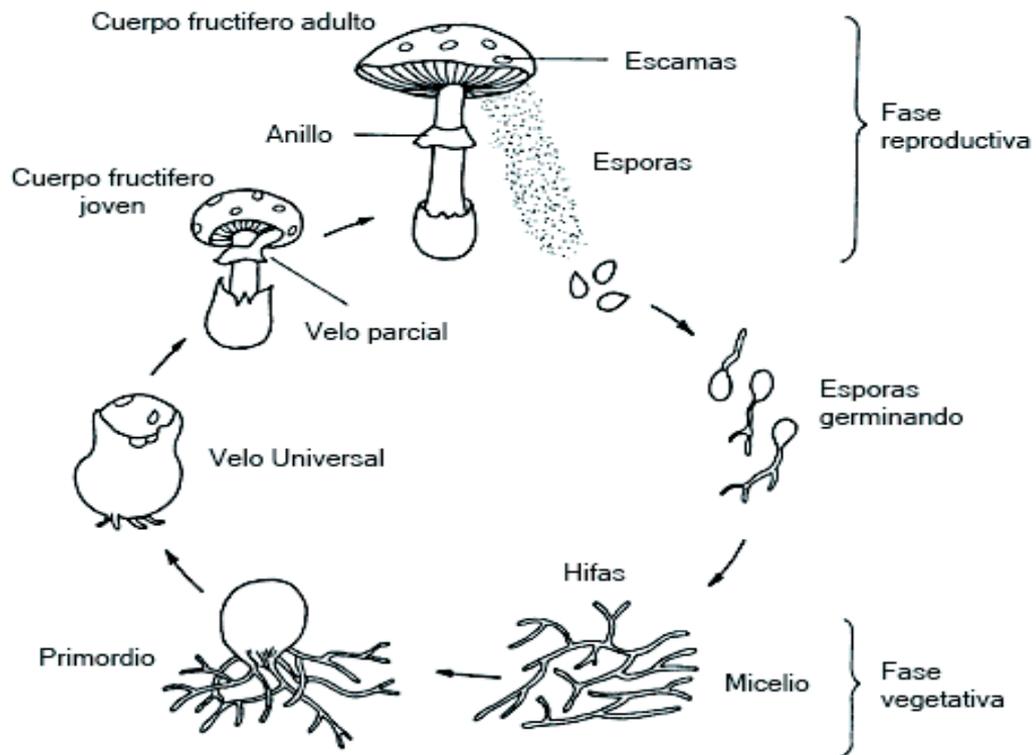


Figura N° 3. Reproducción de hongos basidiomicetes del género *Lentinula*.

Fuente: Mendivil, 2013

La fructificación natural de este hongo ocurre generalmente durante todo el año si las condiciones climáticas son favorables, si el cultivo se realiza en invernadero con condiciones controladas, la fructificación puede ocurrir en cualquier época del año (Silva et al. 2010).

3.3. Valor nutricional del *Lentinula edodes*

La composición nutricional del *Lentinula edodes* (Cuadro N° 2 y 3), indica que es una buena fuente de proteínas, valor que es ligeramente menor a la de alimentos como carne de res 24-31%, cerdo 23-24% (Çağlarirmak 2007) y mayor a cereales como el maíz 8.1 %, el trigo 14.5% y leche 3-4%, también tiene un alto contenido de fibra, vitaminas y concentraciones altas de minerales como potasio, magnesio, calcio, manganeso y cobre (Martínez et al. 2004).

Cuadro N° 2. Composición proximal y nutricional del píleo y estipe del *Lentinula edodes* en 100g (base seca)

Componentes	Píleo	Estipe
Humedad	4.7 g	5.2
Proteína cruda	22.8 g	16.2
Grasa cruda	3.2 g	1.37
Cenizas	6.0 g	9.8
Carbohidratos	48 g	17.8
Fibra	8.4 g	38
Potasio	1032 mg	1200 mg
Fosforo	439 mg	910 mg
Magnesio	200 mg	340 mg
Calcio	127 mg	97 mg
Hierro	20.1 mg	33 mg
Zinc	4.3 mg	5 mg
Manganeso	5.1 mg	8.1 mg
Cobre	0.9 mg	0.9 mg

Fuente: Çağlarirmak, 2007; Bisen *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2013

Cuadro N° 3. Concentración de vitaminas de la seta del *L. edodes* en 100 g

Vitaminas	Concentración
Tiamina (B1)	0,05 mg
Riboflavina (B2)	0.15mg
Niacina	2.6mg
Ácido ascórbico	2,1 mg
Ácido fólico	0.03mg
Vitamina D	-
Pro-Vitamina D ergosterol	679µg

Fuente: Bisen *et al.*, 2010

Al comparar el contenido de proteína del *L. edodes* de 18% con la obtenida de la carne (24-31%), se puede observar que el hongo contiene una cantidad baja de éste nutriente, sin embargo en la proteína del *L. edodes* se encuentran todos los aminoácidos esenciales para el hombre (Cuadro N° 4), ésta composición incluye leucina y lisina en grandes cantidades, las cuales por lo general están ausentes en la mayoría de cereales y sus subproductos (Miles y Chang 2004).

Cuadro N° 4. Composición de aminoácidos esenciales de la seta *L. edodes*

Aminoácidos	Concentración (g16gN)
Treonina	3.2
Valina	6.7
Metionina	0.8
Isoleucina	4.9
Leucina	7.3
Fenilalanina	4.2
Lisina	6.4
Histidina	2.3
Arginina	8.0

Fuente: Bisen *et al.*, 2010

Por otra parte las setas del *Lentinula edodes* contienen bajos porcentajes de lípidos totales (3,2%) comparado con las oleaginosas (>12%), sin embargo es importante destacar que en los lípidos de este hongo se encuentran presentes ácidos grasos, de los cuales el 77.7% son insaturados (Cuadro N° 5), proporcionándole al hongo un valor adicional, debido a que estos aminoácidos son requeridos en la dieta humana (Bisen et al. 2010)

Cuadro N° 5. Composición de ácidos grasos del *L. edodes*

Ácido graso	Concentración en%
C 16,0 Palmítico	19.2
C 18,0 Esteárico	2.7
C 20,0 Araquídico	0.4
C 18,1 Oleico	8.3
C 18,2 Linoléico	68.8
C 18,0 Linolénico	0.6
Total de saturados	22.3
Total de insaturados	77.7

Fuente: Bisen *et al.*, 2010

3.4. Componentes bioactivos del *Lentinula edodes*

Del metabolismo del *L. edodes* se obtienen muchos componentes activos biológicamente, entre los cuales se encuentran:

β -glucanos: Los β -glucanos son polisacáridos no celulósicos constituidos por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos y con ramificaciones β -1-3 o β -1-6. Son aislados principalmente de la pared celular de las células fúngicas (aproximadamente la mitad de la biomasa de la pared celular está constituida de β -glucanos), aunque también pueden ser excretados al medio. Poseen actividades inmunoestimuladoras, anticancerígenas, antiinfecciosas, hipocolesterolémicas, hipoglucémicas, antiinflamatorias y analgésicas. El β -glucano más conocido a nivel mundial es el Lentinán, aislado de *L. edodes* (Suárez y Nieto 2012, Gründemann et al. 2015).

Lentinán: Polisacárido con alto peso molecular (5×10^5 Da); $[\alpha]_D^{20}$ +20-22° (NaOH) polisacárido $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ extraída de la pared celular de cuerpo fructífero en una estructura de triple hélice que contienen sólo las moléculas de glucosa con la mayoría de β -(1-3)-glucosa, vinculada en la cadena principal regularmente ramificado y β -(1-6) cadenas laterales de glucosa (Figura N° 4) (Wasser y Weiss 1999, Mizuno 1995, Wasser 2002).

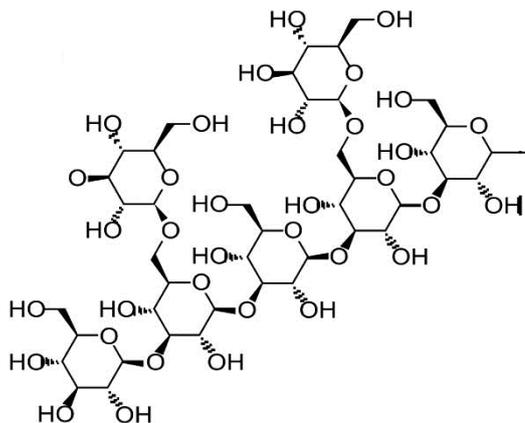


Figura N° 4. Estructura química de Lentinán

Fuente: Bisen *et al.*, 2010

La configuración de la molécula de glucosa en una estructura de hélice se considera que es importante para la actividad biológica y farmacológica, no contiene nitrógeno, fósforo, azufre. Es soluble en agua, lábil al calor estable y álcali (Chibata et al. 1969, Wasser 2002).

El Lentinán actúa como un activador para los linfocitos T de los macrófagos y otras células efectoras inmunes que modulan la liberación de citoquinas, que a su vez puede dar cuenta de su antitumoral indirecta y propiedades antimicrobianas (Rao et al. 2009), trabaja para prevenir enfermedades del corazón mediante la reducción de los niveles de presión arterial y el colesterol, ayudando a la grasa de extracción del sistema y de trabajar como un anticoagulante (Wang et al. 2005)

Akiyama, (1981) encontró que este exopolisacárido posee propiedades anticancerígenas (cáncer de intestino, estómago y ovarios), estimula la secreción de citocinas por células T y que incrementa la generación de linfocitos T y células NK en presencia de interleuquina. Además, investigaciones científicas indican que el Lentinán inhibe el crecimiento de las especies *Physalospora priricola*, *Botrytis cinerea* y *Mycosphaerella arachidicola*, la actividad de la HIV-1 transcriptasa reversa y la proliferación de células de leucemia (Akirama et al. 1981).

Eritadenina: Este compuesto fue aislado del *L. edodes* por primera vez e identificado por Chibata en 1969, su principal capacidad es bajar el nivel de colesterol en la sangre (Figura N° 5), se encuentra presente en el *L. edodes* en concentraciones de 400-700 mg / kg de materia seca mostrando la importancia del hongo como fuente del metabolito (Chibata et al. 1969, Enman et al. 2008).

Este compuesto puede ejercer efecto hipo-colesterolémico modificando el metabolismo de los fosfolípidos a nivel del hígado y por ende aumentando la captación o disminuyendo la liberación de colesterol (Enman et al. 2007).

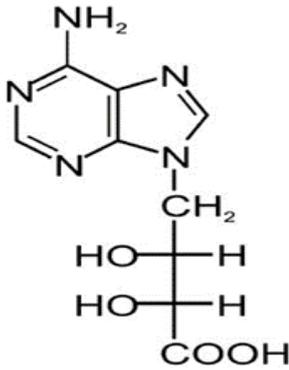


Figura N° 5. Estructura química de la Eritadenina

Fuente: Bisen *et al.*, 2010

Inductor de Interferón γ : Esta es una sustancia química que hace a las células inmunes a infecciones víricas, se ha demostrado que las setas del *Lentinula edodes* contienen el inductor de interferón, Interferón Gamma, el cual es usado para tratamientos contra el cáncer y como antiviral, anti-inflamatorio para el tratamiento de la hepatitis B y C (Chihara 1993).

Ergosterol: El *Lentinula edodes* contiene altos niveles de ergosterol, el cual es precursor de vitamina D el estípite de shiitake contiene 2,97 + 0,56 mg/g y el píleo del hongo tiene aproximadamente 17 mg/g calculado en peso seco (Perera et al. 2003, Jasinghe y Perera 2005). Se ha demostrado en diferentes estudios que el shiitake al ser irradiado con luz ultravioleta o simplemente expuesto al sol, el ergosterol se convierte en vitamina D, que juega un papel importante en el metabolismo del calcio y la mineralización de los huesos (Jasinghe y Perera 2005).

Ácido linoléico: es transformado en el cuerpo en diferentes tipos de prostaglandina. La prostaglandina E₁ es empleada para provocar erecciones en los hombres, por inyección intramuscular eficaz en el tratamiento de problemas de erección masculina (Silva et al. 2010).

Aminoácidos: Glutamina, Arginina, Glicina, Serina, Metionina y Cisteína. La glutamina es el aminoácido de más alta concentración en las setas del *Lentinula edodes*. La arginina estimula los linfocitos T y además previene la pérdida de nitrógeno tras una operación.

Quitina: El 80% de la fibra en el *Lentinula edodes* consiste en la quitina, se ha demostrado que reduce el nivel de colesterol en el plasma sanguíneo en seres humanos. (Rivera et al. 2017). Yen y Mau (2007) aislaron 36.72% de quitina cruda a partir de estípite del *Lentinula edodes* deshidratados. Los estípite del Shiitake han sido usados para preparar quitina y quito sano, estas moléculas tienen propiedades biológicas benéficas como actividad antimicrobiana, incompatibilidad, biodegradabilidad, actividad hemostática y propiedades curativas a heridas (Yen y Mau 2007).

Equipo enzimático: Se ha descrito una lista de 37 enzimas que se encuentran en el *Lentinula edodes*. Estas incluyen celulosa, enzimas digestivos y asparaginasa, ésta última es utilizada en el tratamiento de la leucemia infantil (Silva et al. 2010). También encontramos la súper-óxido dismutasa, que disminuye la peroxidación de lípidos (tratamiento anticancerígeno); la manganeso-peroxidasa y la lacasa-peroxidasa, estas últimas estudiadas por Koga *et al.*, (1991), quienes determinaron que el sistema lignolítico del *Lentinula* estaba expresado en su metabolismo secundario y que la capacidad de degradar lignina era dependiente de la presencia de magnesio. Otras enzimas como las fenol oxidasas, celulasas y xilanasas han sido publicadas analizando el efecto de estas en la digestión de residuos de maíz por *L. edodes* y *Pleurotus ostreatus*, siendo el más eficiente el *Lentinula*. (Silva et al. 2010, Mendoza 2012, Cabrera et al. 2013)

Minerales: Sodio, Potasio, Sílice, Magnesio, Aluminio, Calcio, Hierro, Fósforo, Azufre y Zinc, (el cual aumenta los niveles de testosterona en el plasma.) (Casaril et al. 2011)

Otros constituyentes: También se encuentran el LC11, un β -1-6-D-glucano con ramificaciones en la posición 1-4; peptidomanano KS2, monoglicéridos y ácidos libres, fosfolípidos como el fosfatidil etanolamina y la cardiolipina y cerebrósidos, estos últimos, constituyentes de las neuronas, espermatozoides, leucocitos y hematíes y de gran ayuda en la lucha contra el mal de Fabry (Izuka 1997, Rivera et al. 2017).

3.5. Propiedades medicinales del *Lentinula edodes*

El hongo *Lentinula edodes* ha sido utilizado como alimento saludable y para uso farmacéutico en muchos países en todo el mundo (Jiang et al. 2014), es rico en nutrientes y compuestos con propiedades medicinales (Zhang et al., 2013; Jiang et al., 2014). Varios estudios han demostrado la acción terapéutica de los extractos de este hongo, realizadas debido a la diversidad de sus componentes (Kitzberger et al. 2007)

Actualmente se utilizan los extractos del *Lentinula edodes* para el tratamiento enfermedades que implican la función inmune deprimida (Figura N° 6) como cáncer, problemas respiratorios, enfermedad cardíaca, SIDA, hiperlipidemia (colesterol alto), hipertensión, las enfermedades infecciosas (Bisen et al. 2010), además de sus efectos estimulantes de la salud, incluidos los efectos antivirales, antimicóticos, antioxidantes y antitumorales que aumentan el sistema inmunológico, disminuyen el colesterol, funcionan como anticoagulantes y ayudan en el tratamiento del cáncer (Cuadro N°6) (Watanabe et al. 2003)

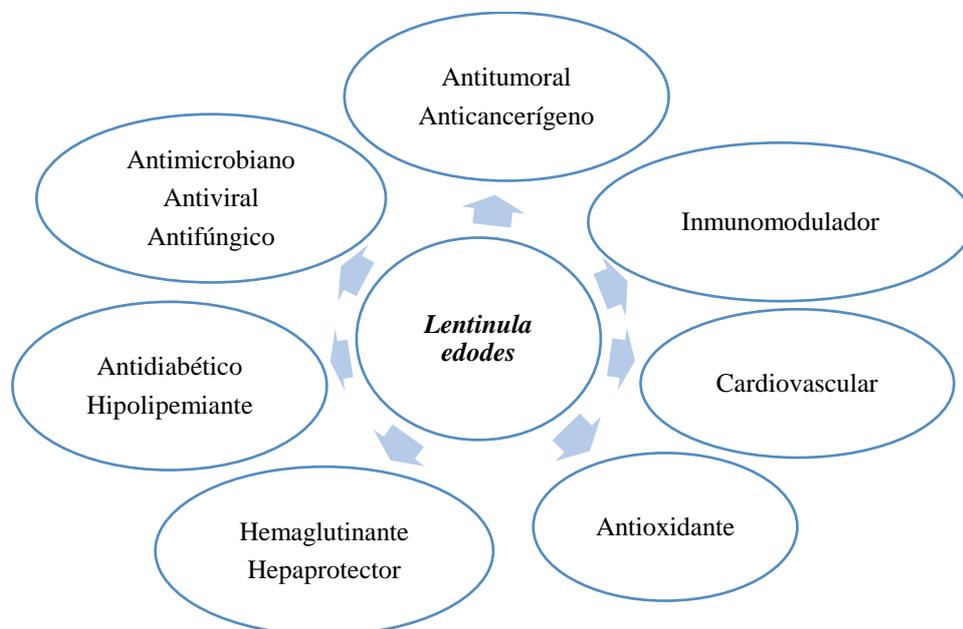


Figura N° 6. Importancia medicinal del *Lentinula edodes*.

Fuente: Bisen et al., 2010

Cuadro N° 6. Efectos terapéuticos y compuestos bioactivos de los extractos del *L. edodes*

Los efectos terapéuticos	Compuestos bioactivos	Referencias
Antitumoral	Lentinán (β -D-glucanos), KS-2-a-manano-péptido, LEM, LAP (heteroglucano-proteína), EP3	(Wasser y Weiss 1999) (Chihara 1993)
Inmunomodulación	Manoglucano, polisacárido complejo de proteínas, glucano, Lentinán, polisacárido L-II, (1-3)-ésimo-D-glucano	(Chihara 1993) (Chibata et al. 1969) (Zhang et al. 2014)
Antimicrobiano	Lentinamicina	(Van Ba et al. 2017) (Casaril et al. 2011) (Kitzberger et al. 2007)
Antivirulento	Lentinán, LEM, JLS-18, EP3, EPS4	(Breene 1990) (Chihara 1993)
Antibacteriano	LEM, lentionina, cloroformo y acetato de etilo extractos	(Kitzberger et al. 2007) (Hirasawa et al. 1999)
Antifúngico	Lentinán	(Hearst et al. 2009)
Cardiovascular y hipolipemiente	Eritadenina, lentinacina, Lentinán	(Chibata <i>et al.</i> , 1969)
hepatoprotector	Lentinán, LEM, extracción con agua caliente y extracción con etanol	(Zhu et al. 1985)
Hemaglutinante	Lectina	(Vetchinkina et al, 2008)
Antioxidante	Metanol y agua, los extractos de compuestos polifenólicos	(Xu et al. 2008)

Fuente: Bisen *et al.*, 2010

3.5.1. Propiedades antitumorales y anticancerígenas

Se ha confirmado clínicamente la capacidad que tienen los extractos del *Lentinula edodes* para prevenir e inhibir la formación de tumores. Así mismo, ha presentado enorme capacidad para prevenir cánceres y metástasis cancerosa (Martínez et al. 2004, Gründemann et al. 2015).

Los compuestos bioactivos del *Lentinula* también exhiben efectos regenerativos a nivel celular, aliviando efectos secundarios derivados de los tratamientos convencionales contra el cáncer, razón por la cual se consideran una excelente alternativa natural para la recuperación de pacientes tratados con quimioterapia. Los estudios han comprobado cinco efectos de regeneración a saber: incremento del número de leucocitos en sangre; recuperación de las funciones del sistema inmunológico del organismo; recuperación del apetito; reducción del dolor; efectos antieméticos y detención de la caída del pelo (Suárez y Nieto 2012).

El efecto antitumoral de un compuesto del *Lentinula*, el lentinán fue confirmada por Chihara *et al.*, (1987) quienes evaluaron las actividades antitumorales y de inhibición de metástasis de este compuesto y determinaron que el lentinán representar una clase única de inmunopotenciador, un adyuvante orientado a células T. El lentinán desencadena el aumento de la producción de diversos tipos de factores séricos bioactivos asociados con inmunidad e inflamación, como IL-1, CSF, IL-3, inductor de la dilatación vascular e inductor de la proteína de fase aguda, por el impacto directo de los macrófagos o indirectamente a través de células T estimuladas.

3.5.2. Actividad antiviral

El *L. edodes* ha sido utilizado para curar el resfriado común durante cientos de años. Más recientemente, algunas evidencias científicas han mostrado la actividad antiviral (expresada como el porcentaje de disminución en la lesión pulmonar puntuación de comparación con el control) de 46%, que era de la misma magnitud

que para el clorhidrato de amantadina, un fármaco común contra la gripe (40%). También se informó de un extracto acuoso de *L. edodes* para evitar la multiplicación del virus de la polio.

El compuesto Lentinán mejoró la latencia del huésped frente a infecciones de bacterias, hongos, parásitos y virus, incluyendo los agentes de SIDA (Chihara 1993), además redujo la toxicidad de azidotimidina AZT (un fármaco comúnmente usado para el tratamiento de portadores de VIH y pacientes con SIDA). La prevención de la aparición de los síntomas del SIDA a través de la potenciación de la defensa del huésped ahora está siendo investigada activamente tanto experimentalmente y clínicamente. El mecanismo de su efecto es en la mayoría de los casos a través de la inducción de interferón (Breene 1990).

El Lentinán también ha demostrado: (a) la actividad antiviral en ratones contra VSV (virus de estomatitis vesicular), virus de la encefalitis, virus de Abelson, un tipo de adenovirus 12; (B) estimulado resistencia no específica contra la infección viral respiratoria en ratones; (C) confirió una protección completa contra una dosis de desafío LD75 de ratón virulento influenza A / SW15; (D) aumento de la resistencia a la protozoos parásitos *japanicum Schistosoma*, *Sch. mansoni*; (E) actividad exhibida contra *Mycobacterium* resistente a fármacos antituberculosos, *subtilis lus Bacil-* bacilos de la tuberculosis, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*; (F) resistencia del huésped a las infecciones con *Listeria monocytogenes* potencialmente letales (Wasser y Weiss 1999).

3.5.3. Actividad cardiovascular y hipocolesterolémica

Las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de muerte en nuestra sociedad y existe una fuerte correlación entre los niveles de colesterol en la sangre y mejora el desarrollo de este tipo de enfermedades. Los principales macrohongos como el *L. edodes*, se han demostrado que produce la

reducción de colesterol en la sangre debido a la acción del compuesto eritadenina 2 (R), 3 (R) dihidroxi-4- (9-adenil) - butírico] (Chibata et al. 1969).

Chibata *et al.*, (1969), adicionó 0.005% de eritadenina en el alimento para ratas, observando una disminución del 25% del colesterol total en tan sólo una semana Enman et al., (2008) concluyeron que la actividad de la eritadenina es mayor si se tiene una dieta alta en grasas. Rivera *et al.*, (2017) llegaron a la conclusión de que una dieta alimenticia con *Lentinula edodes* reduce el colesterol libre en el plasma sanguíneo, reduce la presión arterial y remueve los lípidos del sistema circulatorio

La Eritadenina se sugiere para acelerar la eliminación del colesterol en la sangre ya sea mediante la estimulación de la captación de tejido o mediante la inhibición de liberación de tejido Se demostró que cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta suplementada con 5% (peso seco) de las setas del *L. edodes* durante 10 semanas los niveles de colesterol en plasma de los animales disminuyó significativamente (Enman et al. 2008). Además de los ensayos con animales, la eficacia en la reducción de colesterol en el suero sanguíneo también se ensayó en sujetos. Una ingesta diaria de 90 g de *Lentinula edodes* fresco, 9 g de Shiitake seco, seco durante 7 días rebajado los niveles medios de colesterol en suero en mujeres jóvenes por 12, 7 y 6%, respectivamente . Las dietas disminuyeron de los niveles séricos de colesterol de las personas de edad (60 años de edad) en un 9% más de 7 días (Enman et al. 2007).

3.5.4. Propiedades antihipertensivas

Dentro de la composición del Shiitake se ha reportado un alto contenido de proteína y fibra en el hongo, además que resalta el papel de sus metabolitos secundarios como el Lentinán y la Eritadenina como agentes biológicamente activos en la prevención de determinados tipos de cáncer y por tener un efecto antioxidante y en bajar el colesterol con posible efecto en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Çağlarirmak 2007).

Los altos niveles de colesterol normalmente están asociados a la hipertensión y propensión a enfermedades cardiovasculares en el ser humano. La “lenticina” o “lentinacina” (eritadenina), aceleran la excreción y descomposición metabólica del colesterol ingerido por el organismo (Martínez et al. 2004, Suárez y Nieto 2012). Pero, no sólo los intrametabolitos presentan estas acciones ya que un exo-polímero, familiar a una glicoproteína, aislado del *Lentinula edodes*, cuando se administra en una dosis de 200 mg/kg peso corporal, reduce el nivel plasmático de colesterol total en un 25,1%, mientras que el nivel de triglicéridos desciende en un 44,5%.

El bajo contenido de sodio y alta proporción de potasio en la seta *Lentinula* hacen que sean ideal en la dieta para disminuir la hipertensión (Rivera et al. 2017). La lentinacina, ha demostrado tener una notable actividad antitrombótica, mediante la inhibición de la aglutinación de plaqueta. Así mismo se ha determinado los efectos hipoglicemiantes de un exo-polímero aislado del *Lentinula edodes* (Martínez et al. 2004, Rivera et al. 2017).

3.5.5. Actividad antioxidante

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, que inician reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones en cadena mediante la eliminación de radicales libres e inhiben otras reacciones de oxidación por ser oxidado a sí mismos (Xu et al. 2008).

La actividad antioxidante de *L. edodes* de los extractos obtenidos mediante disolventes orgánicos y fluidos supercríticos usando diferentes técnicas de extracción; operaciones de alta presión y métodos de presión bajos (Kitzberger et al. 2007). McCue *et al.*, (2004) investigaron la capacidad del *L. edodes* para movilizar antioxidantes fenólicos a partir de soja en polvo durante el bioprocesamiento en estado sólido. El *L. edodes* se inoculó en el polvo de soja esterilizado y se determinó

la movilización de antioxidantes fenólicos. Los resultados muestran que este hongo es efectivo en la movilización de antioxidantes fenólicos del polvo de soja. Después del procesamiento, el contenido fenólico aumentó en un 90% en 11,3 mg / g de peso seco en extracto de agua. Y 232% en 5,8 mg / g de extracto seco en extracto de etanol. Además, la movilización antioxidante fenólico se relacionó con la actividad de las enzimas que segmentan carbohidratos α -amilasa y β -glucosidasa, pero no α -glucosidasa, y se asoció con una mayor actividad de lacasa, una enzima implicada en la biodegradación de la lignina (McCue et al. 2004).

3.6. Propiedades antimicrobianas de los Hongos Basidiomicetos

Los hongos basidiomicetos y en general todos los hongos producen una amplia gama de compuestos antibacterianos y antifúngicos para sobrevivir en su ambiente natural. Por lo que no debe sorprender que se puedan aislar compuestos antimicrobianos útiles para el hombre (Yamaç y Bilgili 2006). De interés especial son los compuestos con actividad contra cepas bacterianas multiresistentes, así se pueden encontrar hidroquinonas sesquiterpenoides, llamadas ganomicinas, aisladas de especies europeas de *Ganoderma*, que inhiben el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas para hombre (Lindequist et al. 2005, Yamaç y Bilgili 2006).

La mayoría de los estudios se han realizado en *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus ostreatus* y el hongo no comestible *Ganoderma sp.* Muchas de las sustancias activas incluyen β -glucanos y derivados de ácidos nucleicos como la eritadenina que actúa como agente anticolesterolémico (Suzuki et al. 1989)

Barros *et al.*, (2006) reportaron la actividad antimicrobiana y antioxidante del micelio del hongo *Leucopaxillus giganteus* de extractos metanólicos obtenidos en diversos medios de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno, determinando las concentraciones de fenoles y flavonoides. Se probó el efecto en diferentes cepas bacterianas; Gram positivas como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, y Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Klebsiella pneumoniae, así como sobre el hongo *Candida albicans*. Determinaron la concentración mínima inhibitoria con la técnica difusión radial en agar. Los valores obtenidos se encontraron en un intervalo de 3.12 a 6.25 mg/mL en la cepa bacteriana *S. aureus*, dichos resultados los obtuvieron con los extractos del micelio de *L. gignteus* crecido con dos diferentes fuentes de nitrógeno. En la prueba de sensibilidad, en la cual determinaron los halos de inhibición de los extractos metanólicos de los micelios, observaron que el orden de mayor a menor inhibición fue *S. aureus* > *B. cereus* > *B. subtilis*; mientras que en el resto de los microorganismos probados no se obtuvieron halos de inhibición (Barros et al. 2007).

Asimismo, Barros et al., (2007) investigaron la actividad antimicrobiana de componentes fenólicos bioactivos de los extractos metanólicos de los hongos comestibles portugueses *Lactarius deliciosus*, *Sarcodon imbricatus* y *Tricholoma portentosum*. Evaluaron la concentración mínima inhibitoria de los extractos del hongo completo, así como de sus diferentes partes (píleo o estípite) por separado. Reportando que dichos extractos inhibieron el crecimiento de bacterias Gram + (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*), mientras que *Escherichia coli* (Gram -) mostró resistencia a los extractos. Determinaron la presencia de diferentes compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides los que se encontraron en concentraciones elevadas; así como de ácido ascórbico y licopenos encontrados en concentraciones menores. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue referida como evaluación de la actividad antimicrobiana, donde utilizaron concentraciones de los extractos provenientes de las tres variedades fúngicas de 10, 50, 100 y 300 mg/mL, para detectar que la CMI fue de 10 mg/mL usando el hongo completo (*Lactarius deliciosus*) contra *Bacillus cereus*, obteniendo un diámetro de inhibición mayor a los 9 mm. La diferencia en la actividad antimicrobiana fue debida al contenido total de fenoles (Barros et al. 2007)

Contessa et al., (2016) evaluaron los extractos del *Pleurotus* en diferentes fracciones de purificación frente a bacterias patógenas alcanzando una inhibición del 84% en *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) y el 31% de inhibición en *Escherichia coli*

(gram-negativa), lo que indica que, probablemente, estos extractos son más eficaces contra bacterias Gram-positivas. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Souza et al., (2014) que probó la actividad antimicrobiana de los extractos del *Pleurotus sajor*, logrado la inhibición de 17,5% en *Staphylococcus aureus* y 74,3% para *Escherichia coli*.

Valencia et al., (2008) determinaron el efecto antibacteriano de extractos hexánicos de los carpóforos de las seis cepas de *Pleurotus* los cuales presentaron halos de inhibición en 7 de las cepas bacterianas utilizadas, teniendo un efecto tóxico tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Mostrado mayores efectos antibacterianos para las Gram positivas *B. subtilis* y *S. aureus*, y *S. aureus*, también lo hizo para las cepa Gram negativas *E. agglomerans*, *Y. enterocolitica* y *S. dysenteriae*.

3.6.1. Actividad antimicrobiana del hongo *Lentinula edodes*

La actividad antimicrobiana de los extractos del *Lentinula edodes* se ha investigado ya que las setas se consideran una fuente natural de antibióticos (Smânia et al. 1995), reviste especial importancia en los últimos años dado la aparición de muchas cepas bacterianas multi-resistentes (Hearst et al. 2009). De acuerdo a Hirasawa et al., (1999), el extracto de clorofórmico del *Lentinula edodes* tiene actividad bactericida contra *Streptococcus mutans* (causa caries dental) y *Prevotella intermedia* (agente de la enfermedad periodontal).

Los principios activos contenidos en los extractos del cuerpo fructífero del *L. edodes* exhiben actividad antibacteriana sobre un buen número de microorganismos (Cuadro N° 7). Así mismo, se ha reportado dicha actividad en micelio y medio de cultivo proveniente de la fermentación del *Lentinula edodes* (Hirasawa et al. 1999, Van Ba et al. 2017). Es importante anotar que la actividad antimicrobiana varía de acuerdo al tipo de extracto evaluado y que en algunos casos se atribuye la actividad de los mismos a compuestos tales como la lentinina, derivados disulfuros, ácido gálico y el Lentinán (Kitzberger et al. 2007).

Rao *et al.*, (2009) evaluó una suspensión de polvo liofilizado de *Lentinula edodes* en un peso / volumen igual de 0,1% (p/v) de peptona salina estéril frente a varias bacterias (incluidas patógenas) observando inhibición en su crecimiento (actividad bacteriostática), estudio concordante con el realizado por Van Ba *et al.*, (2017), quiénes indicaron que la actividad antibacteriana y antifúngica del *Lentinula edodes* se debe a los compuestos de lentionina como: la cicloheximida, bostrycoidina, alcaloides anticarcinogénicos, taninos (epiafzelequina) y terpenoides (adiantona) encontrando además que actividad antimicrobiana se debe mayormente a la presencia de disulfuros (Van Ba *et al.*, 2017). Se ha explorado el posible uso del hongo como controlador biológico de fitopatógenos (Hearst *et al.* 2009), mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* y el virus del mosaico del tabaco (VMT), demostrándose la inhibición de bacterias, micro-hongos y del virus VTM por parte del *Lentinula edodes* (Van Ba *et al.* 2017, Gadea *et al.* 2017).

Cuadro N° 7. Estudios de actividad antimicrobiana del *Lentinula edodes*

Material evaluado	Extracto	Microorganismo ensayado	Referencias
Carpóforo	Cloroformo	<i>Streptococcus</i> sp., <i>Actinomyces</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.,	Hirasawa <i>et al.</i> 1999
	Acetato de etilo Acuoso	<i>Prevoytella</i> sp., <i>Porphyromonas</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Sthaphylococcus</i> sp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., y <i>Candida</i> sp.	
Micelio	Cloroformo Metanol (9:1)	<i>Campylobactor</i> jenjuni, <i>Streptococcus</i> pyogenes, <i>Sthaphylococcus</i> aureus, , <i>Pseudomonas</i> fluorescens, <i>Micrococcus</i> luteus, <i>Klebsiella</i> pneumoniae, <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i>	Hatvani 2001

Micelio	Acuoso	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Sthaphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrimus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>	De Carvalho et al. 2007
Carpóforo	Fluido supercrítico CO ₂ co-solventes Etanol Diclorometano Acetato de etilo	<i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> y <i>Candida albicans</i>	Kitzberger et al., 2007
Carpóforo	Acuoso	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilis</i> , <i>Cupriavides sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella erogenes</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Salmonella poona</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia/Rapnella sp.</i> , <i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Sthaphylococcus epidermidis</i> , <i>Sthaphylococcus sp.</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigates</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i>	(Hearst et al., 2009)
Carpóforo	Acuoso	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	(Pereira et al., 2011)

Fuente: Bisen et al., 2010

Kitzberger *et al.*, (2009) aplicaron técnicas de maceración en frío (COSE) y presiones altas usando disolventes orgánicos como: n-hexano, acetato de etilo y diclorometano para la obtención de extractos del hongo *Lentinula edodes* que fueron evaluados contra cuatro cepas de bacterias y una cepa fúngica usando el método de dilución en agar, reportando la inhibición en el crecimiento de *M. luteus* y *B. cereus* (bacterias gram positivas) y escasa inhibición frente a *S. aureus* y *E. coli*. Además estos extractos mostraron actividad antifúngica frente a la levadura *C. albicans*, todos los resultados se consideraron inhibitorios con halos de inhibición mayor o igual 9 mm, causada probablemente por la interacción entre la mezcla de disolventes y compuestos del *Lentinula edodes* en condiciones de alta presión. El análisis antimicrobiano indica mayor eficiencia de los extractos supercríticos en comparación con los extractos de baja presión (COSE) para los microorganismos experimentados.

Asimismo Casaril *et al.*, (2011) evaluó la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de *Lentinula edodes* frescos, utilizando 50 g de hongo y una solución de metanol al 90 %, macerada a temperatura ambiente durante 24 h. Este extracto purificado por métodos físicos se valuó en el crecimiento de bacterias *B. subtilis* y *E. coli*, en extracto acuoso Miller Hinton mostrando inhibición del crecimiento de estas. Los extractos del *Lentinula edodes* muestran actividades antimicrobianas contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas concordante con investigaciones realizadas por otros autores (Komemushi *et al.* 1996, Venturini *et al.* 2008).

Hearst *et al.*, 2009 determinaron la actividad antimicrobiana de los dos extractos acuosos de hongos *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* contra 39 bacterias, levaduras y hongos patógenos (Cuadro N° 8).

Cuadro N° 8. Diámetros en milímetros de la zona de inhibición producida en una amplia gama de microorganismos frente a los extractos de *L. edodes* y *P. ostreatus*

Microorganismo	Seta		Control+
	<i>L. edodes</i>	<i>P. Ostreatus</i>	Ciprofloxacina
Bacterias			
<i>Bacillus cereus</i> NCTC 7464	12	5	24
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400	11	7	33
<i>Bacillus pumilis</i>	14		26
<i>Cupriavidis sp</i>	15		27
<i>E. coli</i> NCTC 25922	12		29
<i>E. coli</i> NCTC 9001	9		27
<i>E. coli</i> 0157 NCTC 12900	10		27
<i>Enterobacter / Klebsiella sp.</i>	10		34
<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	8		15
<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 9528	9		24
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603	8		23
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	11		28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 1662	9	20	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 27853	9		28
<i>Pseudomonas sp 1</i>	86		
<i>Pseudomonas sp 20</i>	8		18
<i>Pseudomonas sp 3</i>	9		
<i>Pseudomonas sp 6</i>	92		20
<i>Salmonella Poona</i> NCTC 4840	9		26
<i>Serratia marcescens</i>	10		26
<i>Serratia / Rahnella sp.</i>	9		40
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) 25 923	12		25
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 43 300	12		19
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 14990	11		28
<i>Staphylococcus sp.</i> NCTC 6571	12		27
<i>Bacterias Wildtype</i> mano 1	10		23
<i>Bacterias Wildtype</i> mano 2	12		24
<i>Bacterias Wildtype</i> mano 3	14		24
Levaduras y hongos filamentosos			
<i>Aspergillus flavus</i> QC 6658			ND
<i>Aspergillus fumigatus</i> 27,5	20		ND
<i>Aspergillus niger</i> 27,5	10		ND
<i>Candida albicans</i>			ND
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258 27,5	15		ND
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	11		ND
<i>Exophiala (Wangiella) dermatitidis</i> QC			ND
<i>Penicillium sp.</i> QC 743275			ND
<i>Scedosporium QC apiospermum</i> 7870	12		ND

Fuente: Hearst *et al.*, 2009

3.7. Extractos Vegetales y Fúngicos

Un extracto es una mezcla fluida de multitud de compuestos químicos concentrados que se obtiene de una planta o cualquier parte de ella, hongos u otro material, mediante diversos procedimientos físico-químicos (Ruiz y Susunaga 2000). La extracción referida a los procesos tecnológicos de la industria química, fotoquímica, es la operación de separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes apropiados, tales como agua, etanol, éter, entre otros, que al contacto con los materiales en estado fresco o seco extraen elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes (Wichtl 2004, Azmir et al. 2013).

Para lograr una concentración adecuada de principios activos y que su acción sea más efectiva, es necesario realizar diversos procedimientos utilizando solventes adecuados que se seleccionan de acuerdo a la solubilidad y la estabilidad que posean las sustancias que se desea extraer (Wichtl 2004). Existen diferentes métodos de extracción como: maceración, percolación, infusión, digestión, decocción, además de técnicas utilizadas frecuentemente para la extracción de compuestos bioactivos: maceración, extracción soxhlet, hidrodestilación y por fluidos supercríticos (Wichtl 2004, Azmir et al. 2013). Estos métodos extractivos se han perfeccionado permitiendo combinar dos o más de ellos ,obteniendo sustancias activas más puras las cuáles son utilizadas para la elaboración sofisticada de medicamentos (Wichtl 2004).

Para realizar análisis fotoquímicos se utilizan materiales frescos o deshidratados, el secado debe llevarse a cabo bajo condiciones controladas para evitar que ocurran cambios químicos. La extracción se realiza en frío o en caliente y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen (Harborne 1998, Azmir et al. 2013).

3.7.1. Método de extracción por Maceración

La maceración ha sido utilizada hace mucho tiempo en la preparación casera de tónicos para tratar algunas enfermedades. Se convirtió en una forma popular y económica de conseguir aceites esenciales y compuestos bioactivos. Para la extracción a pequeña escala, la maceración generalmente consta de varios pasos. En primer lugar, se tritura la parte de planta de la que se desea extraer los compuestos, en pequeñas partículas para aumentar el área superficial y obtener una mezcla adecuada con el disolvente. En segundo lugar esta mezcla llamada disolución se la coloca en un recipiente cerrado por un tiempo, dependiendo de la concentración deseada, el disolvente utilizado y los compuestos activos a extraer. En tercer, la fase líquida se separa de las impurezas por filtración, las impurezas filtradas forman el pallet, que es el residuo sólido de este proceso de extracción. En la maceración, una agitación constante facilita la extracción de dos maneras; (a) aumentar la difusión y (b) ayuda a obtener un mayor rendimiento en el proceso de extracción (Azmir et al. 2013).

3.7.2. Método de extracción Soxhlet

Soxhlet, (1879) propuso un método de extracción ampliamente utilizado para separar componentes bioactivos a partir de diversas fuentes naturales. Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos. El solvente más ampliamente utilizado para extraer aceites comestibles de las plantas es el hexano. El hexano tiene un rango en el punto de ebullición bastante estrecho, de aproximadamente 63–69 °C y es un excelente solvente de los aceites en lo que se refiere a su solubilidad y facilidad de recuperación (Mamidipally y Liu 2004). En general, una pequeña cantidad de muestra seca se coloca en un dedal. El dedal se coloca entonces en el matraz de destilación, que contiene el disolvente de particular interés. Después de alcanzar a un nivel de desbordamiento, la solución del dedal titulado es aspirado por un sifón. El sifón descarga la solución de nuevo en el matraz de destilación. Esta solución acarreada extrajo solutos en el líquido a granel. El soluto se quedó en el matraz de destilación y el disolvente pasa de nuevo al lecho

sólido de la planta. El proceso se ejecuta repetidamente hasta que se completa la extracción (Azmir et al. 2013). Durante la extracción con Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos.

3.7.3. Método de extracción por Hidrodestilación

Es un método tradicional para extracción de compuestos bioactivos y aceites esenciales de plantas. Hay tres tipos de hidrodestilación: la destilación de agua, destilación de agua y vapor y destilación directa de vapor (Verma et al. 2008). En la hidrodestilación, primero los materiales vegetales se cortan en pequeños trozos; segundo se añade agua en cantidad suficiente y luego se lleva a ebullición. Alternativamente, se inyecta vapor directo en la muestra de la planta. El agua caliente y el vapor actúan como los principales factores de influencia para liberar compuestos bioactivos del tejido vegetal. El enfriamiento indirecto por agua condensa la mezcla de vapor de agua y aceite. La mezcla condensada fluye desde el condensador a un separador, donde el aceite y los compuestos bioactivos se separan automáticamente del agua (Silva et al. 2005). La hidrodestilación implica tres principales procesos fisicoquímicos; la hidrodifusión, la hidrólisis y la descomposición por el calor. A una temperatura alta de extracción pueden perderse algunos componentes volátiles. Este inconveniente limita su uso para la extracción de compuestos lábiles (Azmir et al. 2013).

3.7.4. Método de extracción por Fluidos Supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Brunner 2005).

Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión (Rozzi y Singh 2002). El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, y otras características que permiten una extracción segura y con mayor pureza (Brunner 2005, Velasco et al. 2007)

3.8. Bacterias

Entre los microorganismos patógenos más comunes en los alimentos se encuentran las bacterias, las cuales son microorganismos unicelulares procariotas (pro de primitivo y cariota de núcleo), que se reproducen por fisión binaria (Pírex y Mota 2006). Las bacterias poseen una pared celular. La forma e integridad de la pared celular, se deben fundamentalmente a un peptidoglucano (mureína), polímero compuesto por dos azúcares (glucosamina y ácido murámico) y aminoácidos. La pared puede proteger a una célula frente a sustancias tóxicas y es el lugar de acción de varios antibióticos (Willey et al. 2009)

Después de que Christian Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre, en 1884, clasificó a las bacterias en dos grupos principales Gram positivas y Gram negativas, según su respuesta a este método de tinción (Rozman et al. 2012). Las bacterias Gram positivas se tiñen de color morado al exponerse al método de tinción, su pared celular está formada por una única capa homogénea de 20 a 80 nm de grosor de peptidoglucano, que se encuentran entrelazadas por puentes peptídicos conteniendo considerables cantidades de ácidos teicoico y teicurónico (polímeros hidrosolubles que contienen ribitol). (Books et al. 2005, Willey et al. 2009).

Las bacterias Gram negativas adquieren un color un color rosa a rojo al momento de su tinción, su pared celular constituye una pequeña porción, de 2 a 7 nm de peptidoglucano rodeada de una membrana externa de 7 a 8 nm, contienen tres componentes que están en el exterior de la capa y son: lipoproteína, membrana externa y lipopolisacárido (Willey et al. 2009, Rozman et al. 2012). Su membrana

externa sirve como barrera protectora, puesto que reduce o impide la entrada de antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar a la bacteria además puede incapacitar las defensas del huésped cambiando rápidamente la naturaleza de sus cadenas laterales para evitar su detección (Willey et al. 2009).

La pared celular es necesaria para proteger a las bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas de agentes externos, como el efecto destructivo de la presión osmótica (Willey et al. 2009), fenómeno físico que desplaza el agua a través de la membrana plasmática. La membrana plasmática no podría soportar las presiones que la célula alcanza (hasta de 20 atmósferas) y la célula se hincharía, alterándose físicamente y destruyéndose, proceso denominado turgencia, fenómeno físico soportado por la pared bacteriana (Winn y Koneman 2008, Books et al. 2005), demostrando su protección al tratarlas con penicilina, antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglicano (Rozman et al. 2012).

Si se incuban bacterias Gram positivas en una solución isotónica con penicilina, estas bacterias se convierten en protoplastos, es decir, en células que carecen de pared celular. Mientras que las bacterias Gram negativas conservan la membrana externa después del tratamiento con penicilina y se denominan esferoplastos. Los protoplastos y esferoplastos son osmóticamente sensibles. Si se transfieren a una solución diluida se lisan debido a la entrada descontrolada de agua (Willey et al. 2009).

3.8.1. Bacterias patógenas en los alimentos

Las bacterias que contaminan los alimentos y producen alteraciones en el huésped se consideran patógenos. Hay dos categorías de enfermedades causadas por estas bacterias: las intoxicaciones alimentarias, causadas por toxinas producidas por los microorganismos, y las infecciones alimentarias causadas por el crecimiento de los éstos en el cuerpo humano, luego de haber ingerido alimentos contaminados (Romero 2007, Hernández 2010)

Existen tres bacterias que son las responsables de la mayoría de estas enfermedades y son: *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* entre otras. Estos patógenos pueden encontrarse en los alimentos de manera natural, lo que no quiere decir que siempre provoquen enfermedades (Fundazioa 2014).

3.8.1.1. *Listeria spp*

La *Listeria* es un bacilo Gram positivo, aerobio, psicrótrofo, halo tolerante, no móvil, no esporulado (Figura 7 y 8). La *L. monocytogenes* es la responsable de la mayor parte de las infecciones por *Listeria* que afectan al hombre, en la última década, la listeriosis ha sido una de las principales enfermedades de origen alimentario, por su gran interés para la salud pública y su impacto económico, en animales es responsable de la mayoría de las infecciones, pero en ovejas el 10–15% de los casos de septicemia listérica se deben a *L. ivanovii* (Vallat et al. 2004).



Figura N° 7. *Listeria* en caja de Petri

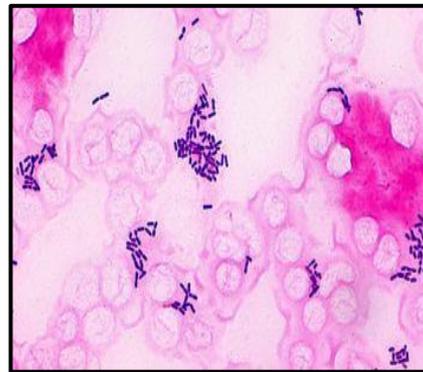


Figura N° 8. *Listeria* vista desde el microscopio óptico

El género *Listeria* engloba seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenas. La primera es un patógeno humano; en cambio, la segunda es un patógeno animal (Hernández 2010, García 2011).

En cuanto a temperaturas de crecimiento, tiene un límite muy amplio, comprendido entre 1 - 45 °C, con una óptima de 30 – 37 °C. Es una bacteria psicrotrófica. Para que se destruya se necesita alcanzar una temperatura de 70 °C alrededor de 2-3 minutos, Además, la congelación no va a reducir el tamaño de la población bacteriana respecto al pH, es capaz de desarrollarse entre 5,1 y 9,6. Su pH óptimo es 7,5 (Romero 2007, García 2011).

3.8.1.2. *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos pequeños, Gram-negativos, no esporulados, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos aunque hay algunas especies que son inmóviles. El tamaño oscila de 0,3µm x 1,0-1,6 µm (Figura 9 y 10). Son aero-anaerobios facultativos, quimiorganótrofos y poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo, produciendo ácido y, a menudo, gas (Hernández 2010, García 2011).

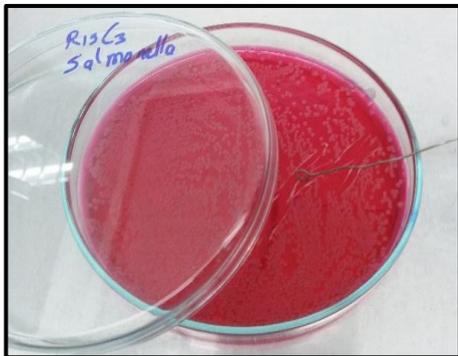


Figura N° 9. *Salmonella* en caja de Petri

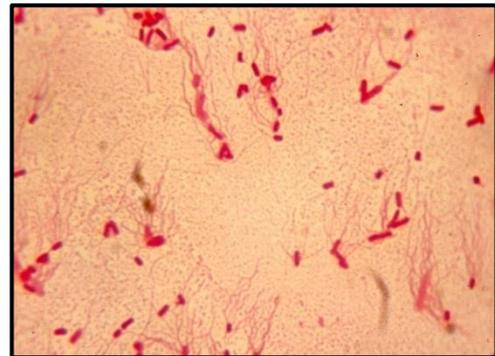


Figura N° 10. *Salmonella* vista desde el microscopio óptico

Salmonella es capaz de crecer a temperaturas por debajo de 5 °C incluso hasta una temperatura de 47 °C, con un crecimiento óptimo de 37 °C. También se ha demostrado su crecimiento en productos almacenados entre 2 y 4 °C. A una temperatura de 60°C o superior se destruyen entre los 5-15 minutos, ya que son sensibles al calor. La pasteurización a 72 °C durante 15 segundos va a asegurar la destrucción de la bacteria en la leche. En cuanto al pH, puede crecer en valores entre

4,5 y 9,5, con un pH óptimo de 6,5-7,5. Puede llegar a crecer a un pH de 4,05. (Romero 2007, García 2011).

La *Salmonella* es el microorganismo causante de una infección en el revestimiento del intestino delgado; existen 2,200 serotipos de esta bacteria. La enterocolitis por salmonella es uno de los tipos más comunes de intoxicación alimentaria y ocurre cuando la persona consume alimentos o agua contaminados con la bacteria salmonella. Cualquier alimento se puede contaminar durante la preparación si las condiciones y el equipo empleado en el proceso no son higiénicos (Romero 2007, Hernández 2010).

3.8.1.3. *Escherichia Coli*



Figura N° 11. *E. coli* en caja de Petri

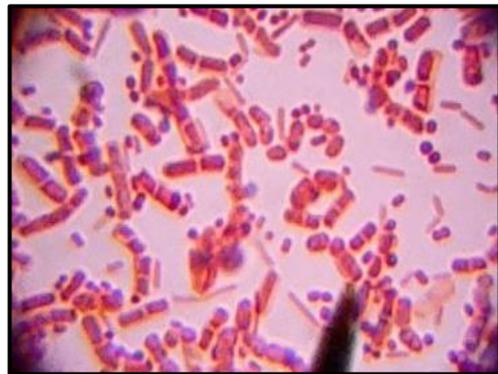


Figura N° 12. *E. coli* vista desde el microscopio óptico

Es una bacteria Gram-negativa, de forma bacilar corta, catalasa positiva, oxidasa negativa y anaerobia facultativa, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia* (Figura 11 y 12). Muchas de las cepas de *E. coli* no producen enfermedad, y se consideran comensales saprófitos. Sin embargo, se han determinado varios tipos de *E. coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia (García 2011). La *E. coli* es un huésped universal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente. Dado que está presente de forma habitual en las heces, su fácil cultivo, su carácter patogénico y su supervivencia en

agua, se ha adoptado como indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua. Puesto que *E. coli* es un huésped del tracto intestinal, fuera de éste va a vivir durante muy poco tiempo (Hernández 2010, García 2011).

E. coli crece en unos límites de temperatura amplios, entre 15 y 45 °C. En cambio, hay algunas cepas que crecen a temperaturas tan bajas como son 4 °C. Normalmente su temperatura óptima va a ser 44 °C. El calor los destruye a 60 °C en 15 minutos y a 55 °C en una hora, es decir, se elimina a temperatura de pasteurización y también cuando se almacena el producto en frío, sobre todo a temperatura de congelación (Romero 2007, García 2011).

3.8.2. Mecanismo de acción de los antibacterianos

Para que los antimicrobianos puedan usarse deben ser eficaces a dosis bajas y selectivas en su acción, de modo que produzcan el efecto inhibitor deseado sobre los microorganismos sin producir lesión al huésped. El origen de esta toxicidad selectiva radica en las diferencias existentes en las estructuras y/o vías metabólicas entre las células eucariotas y las procariotas, lo que requiere de células sensibles a la acción específica de los antimicrobianos (Rozman et al. 2012).

Los antimicrobianos pueden clasificarse en dos grandes grupos: bacteriostáticos y bactericidas. Con el primer término se designa al efecto inhibitor del crecimiento reversible de los microorganismos, ya que al cesar la acción del fármaco, puede recuperarse el crecimiento microbiano. Por el contrario los bactericidas interfieren en estructuras o funciones esenciales para la vida del microorganismo inhibiendo su crecimiento irreversiblemente. La obtención de un efecto u otro depende no sólo del antimicrobiano sino que también intervienen otras variables, como el agente que produce la infección, la densidad de la población microbiana, las condiciones del medio, la fase de crecimiento y la concentración de antimicrobiano en el foco de infección (Madigan et al. 2009, Rozman et al. 2012)

Los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, los cuales actúan por diferentes mecanismos y cuyos blancos de acción se encuentran en diferentes regiones de la célula bacteriana que será afectada, impidiendo que ésta pueda reproducirse, así la concentración bacteriana disminuirá por la acción del fármaco (Cuadro N°) (Martínez y Sanchez 2007, Rozman et al. 2012).

Cuadro N° 9. Mecanismo de acción de antibacterianos y su clasificación de acuerdo a su estructura química

Fármaco	Mecanismo de acción
Inhibición de la síntesis de la pared celular	
Penicilina ^a Ampicilina ^b Carbeniciclina ^c	Inhiben las enzimas de transpeptidación que participan en los enlaces entre las cadenas polisacáridas del peptidoglicano de la pared celular bacteriana.
Meticiclina Cefalosporina ^d Vancomicina ^e	Se ligan directamente al dipéptido terminal D-Ala-D-Ala e inhibe la traspeptidación.
Bacitracina	Inhibe la síntesis de la pared celular interfiriendo en la acción del portador lipídico que transporta precursores de la pared a través de la membrana plasmática
Inhibición de la síntesis proteica	
Estreptomicina ^f Gentamicina ^f	Se ligan a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano para inhibir la síntesis proteica y causan errores de lectura del mRNA.
Cloranfenicol ^k	Se ligan a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano para inhibir la síntesis proteica y causan errores de lectura del mRNA.
Tetraciclina ^g Eritromicina ^h Clindamicina ⁱ Ácido fusídico ^j	Se ligan a la subunidad 30S del ribosoma e interfieren con la unión aminoacil-RNA Se ligan a la subunidad 50S del ribosoma e inhiben la elongación de la cadena peptídica. Se liga a EF-G y boquean la translocación

Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Ciprofloxacina Otras quinolonas	Inhiben a la enzima DNA girasa bacteriana y así interfieren en la replicación del DNA, la transcripción y otras actividades en las que participa el DNA
------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Alteración de la membrana celular

Polimixina B ¹	Se liga a la membrana plasmática y altera su estructura y sus propiedades de permeabilidad
---------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------

Antagonismo metabólico**Inhibición en la síntesis de ácido fólico**

Sulfamidas ^m Trimetoprima ^m	Inhiben la síntesis de ácido fólico compitiendo con el ácido <i>p</i> -aminobenzoico
Dapsona Isoniazida	Bloquea la síntesis de tetrahidrofolato por inhibición de la dihidrofolato reductasa. Interfiere en la síntesis del ácido fólico. Puede alterar el metabolismo y funcionamiento de pirodixal y del NAD. Inhibe la síntesis del ácido micólico (factor de encordamiento)

Fuente: Willey *et al.*, (2009); Winn y Koneman, (2008)

3.8.3. El Antibiograma de discos, técnica de Kirby-Bauer

Es una técnica utilizada para medir la sensibilidad in vitro de un inóculo bacteriano estándar frente a diferentes antimicrobianos y a partir de estos resultados predice la eficacia del compuesto. Con un antibiograma se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico. En efecto, la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico. El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales (Joyce y Woods 2004, Cercenado y Saavedra 2009).

La interpretación de los resultados del antibiograma (sensible, intermedio o resistente) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, como el Clinical and Laboratory Standards Institute en Estados Unidos, el European

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing en Europa y la Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos. Estos comités determinan y establecen puntos de corte basados en propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y de eficacia clínica, para definir la sensibilidad (éxito terapéutico) o resistencia de las diferentes especies bacterianas a cada antimicrobiano (Joyce y Woods 2004, Cercenado y Saavedra 2009).

Entre las técnicas de difusión en Agar más utilizados para el análisis de sensibilidad se encuentra la propuesta por Bauer et *al.*, (1966), en esta técnica, el inóculo bacteriano llevado a una concentración igual a la del estándar 0,5 de McFarland, se aplica sobre la superficie de una placa seca de agar Müller-Hinton que tenga un pH entre 7, 2 y 7,4 medido a temperatura ambiente y una vez solidificado el medio de cultivo. La cepa se debe inocular sobre la superficie del medio solidificado el medio de cultivo. La cepa se debe rayar sobre la superficie del medio de forma tal que se logre un crecimiento confluyente. Una vez realizado esto, en un plazo no mayor de 15 minutos, se procede a colocar los discos o las pastillas con el antibiótico. Si se emplean placas de Petri de 100 mm de diámetro, el número máximo de discos a colocar es de 5, luego la placa se incuba a 35°C por un periodo no mayor a las 24 horas (Figura N° 13) (Joyce y Woods 2004, Cercenado y Saavedra 2009).

Cada caja es observada en luz indirecta y cada halo de inhibición es medido utilizando un calibrador o en su defecto una regla graduada en la forma adecuada, los antibiótico tiene su halo de inhibición específico y éste depende del tamaño de la molécula del antibiótico y su polaridad; de esta manera, un antibiótico con un peso molecular bajo como la penicilina, tendrá mucha capacidad para migrar, por lo tanto su halo, en el caso de una cepa sensible tendrá un diámetro muy amplio. En el caso de la vancomicina, que tiene una molécula muy grande y muy hidrofóbica, su halo de inhibición será muy pequeño. De esta manera, no se puede afirmar, que para una cepa determinada, ésta es más sensible a la penicilina que a la vancomicina, sólo porque el primero tenga un halo de inhibición mucho mayor (Joyce y Woods 2004, Cercenado y Saavedra 2009). La técnica de difusión en agar,

presenta varias ventajas como: Es fácil de efectuar y de gran reproducibilidad, bajo precio, no requiere equipo especial, sus resultados son fácilmente interpretados por los clínicos y es muy flexible a la hora de escoger los antibióticos a probar

Dentro de sus desventajas está el hecho de que brinda sólo información cualitativa, otra desventaja y la más importante, es que esta técnica debe ser modificada para poderla emplear en organismos fastidiosos o de crecimiento lento (Joyce y Woods 2004, Cercenado y Saavedra 2009).

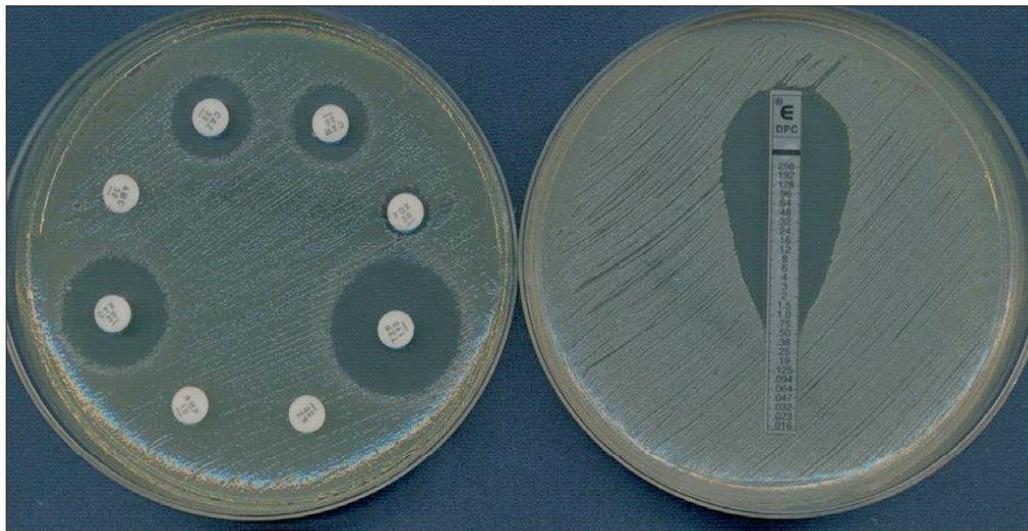


Figura N°13. Antibiograma por difusión con discos en el que se observa la presencia de halos de inhibición

CAPÍTULO IV

MARCO METODOLÓGICO

4.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la planta piloto de Fermentaciones Sólidas y los análisis en los Laboratorios del Departamento Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

Tabla N° 1. Localización de la investigación

Ubicación	Localidad
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Veintimilla
Sector	Laguacoto II Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

Fuente: Estación Meteorológica Laguacoto II (2017).

4.2. Situación geográfica y climática de la localidad

Tabla N° 2. Situación geográfica y climática

Parámetros climáticos	Valor
Altitud	2640 m.s.n.m
Latitud	01° 34`15” S
Longitud	78° 59`54” W
Temperatura media anual	13 °C
Temperatura máxima	18 °C
Temperatura mínima	8° C
Humedad Relativa	75%
Precipitación	110mm
<i>Heliofanía</i> (H/L)Año	900

Fuente: Estación Meteorológica Laguacoto II (2017).

4.2.1. Zona de vida

De acuerdo con la clasificación de las zonas de vida L. *Holdridge* el sitio corresponde a la formación de Bosque Húmedo Montano Bajo (BHMB).

4.3. Materiales

4.3.1. Material experimental

- Setas de *Lentinula edodes*.
- Disolventes (Cloroformo, etanol, acetato de etilo, solución de 50% de agua con 50% de etanol).
- 1 Cepa de *Escherichia coli spp* aislada de carne de res.
- 1 Cepa de *Salmonella spp* aislada de carne de cerdo.
- 1 Cepa de *Listeria spp* aislada de carne de res.

4.3.2. Reactivos

- Agua destilada
- Nutrient Agar
- Chromogenic Listeria Agar
- Bacter Agar
- XLD Agar
- Müller Hinton Agar
- Cloruro de sodio

4.3.3. Equipos y materiales

- Autoclave
- Incubadora
- Refrigeradora
- Cámara de flujo laminar

- Centrífuga termoregulable
- Balanza Digital
- Agitador Vórtex

4.3.4. Material de laboratorio

- Cajas Petri
- Tubos con tapa rosca
- Pipeta de 10 mL
- Vasos de precipitación
- Embudo
- Probeta graduada
- Frascos ámbar de vidrio
- Mechero Bunsen
- Calibrador de vernier
- Pinzas
- Asa bacteriológica
- Tubos para centrífuga.
- Papel aluminio
- Hisopos estériles
- Escala McFarland parámetro de turbidez 0.5
- Discos en blanco de 6 mm de diámetro (antimicrobial susceptibility test)
- Papel filtro
- Papel film

4.3.5. Materiales de oficina

- Computadora
- Impresora
- Cámara fotográfica.
- Material de escritorio
- Papel de impresión

4.4. Métodos

4.4.1. Factores de estudio

Para el presente estudio se planteó dos factores en estudio; factor a: partes del hongo *Lentinula edodes*; factor b: tipos de disolventes

Tabla N° 3. Factores de estudio en la investigación

Factores	Código	Combinaciones
Partes del hongo <i>Lentinula edodes</i>	a	a1 = Estipe a2 = Píleo
Disolventes	b	b1 = Cloroformo b2 = Etanol b3 = Acetato de etilo b4 = 50% etanol + 50% de agua

Fuente: Sanabria, (2018).

4.4.2. Esquema del experimento

Tabla N° 4. Esquema del experimento, descripción de las combinaciones A x B

Tratamientos	Código	Descripción factorial
1	a ₁ b ₁	Estipe del <i>Lentinula</i> + Cloroformo
2	a ₁ b ₂	Estipe del <i>Lentinula</i> + Etanol
3	a ₁ b ₃	Estipe del <i>Lentinula</i> + Acetato de Etilo
4	a ₁ b ₄	Estipe del <i>Lentinula</i> + 50% de etanol + 50% agua
5	a ₂ b ₁	Píleo del <i>Lentinula</i> + cloroformo
6	a ₂ b ₂	Píleo del <i>Lentinula</i> + Etanol
7	a ₂ b ₃	Píleo del <i>Lentinula</i> + Acetato de Etilo
8	a ₂ b ₄	Píleo del <i>Lentinula</i> + 50% de etanol + 50% agua

Fuente: Sanabria, (2018).

4.4.3. Características del experimento

Factores en estudio= 2

Unidad experimental = 100 mL de disolvente y 15 g de hongo

Tratamientos= 8

Repeticiones= 3

Unidades experimentales= 24

4.4.4. Tipo de diseño experimental

En la presente investigación se aplicó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con tres repeticiones, el cual se ajusta al siguiente modelo lineal.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Valor de la variable en consideración

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = Efecto del j-ésimo repetición

ε_{ij} = Efecto del error experimental

4.4.5. Análisis Estadísticos

Para establecer las diferencias entre los tratamientos se aplicó el análisis de varianza (Tabla N° 5) y para conocer las diferencias entre las medias de los tratamientos se aplicó la prueba de Tukey al 5 %, Para el análisis de resultados se utilizó el programa estadístico InfoStat.

Tabla N° 5. Análisis de varianza para el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA).

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M	F _c	F _t
Total	(rt - 1)	$\left[\sum_1^r X^2 - \left(\sum_1^r X \right)^2 \right] / rt$			
Tratamiento	(t - 1)	$\sum_1^t \left(\sum_1^r X_i \right)^2 / t - FC$	SC/gl	$\frac{C.M._t}{C.M._E}$	$\frac{C.M._t}{C.M._E}$
Repeticiones	(r - 1)	$\sum_1^t \left(\sum_1^r X_j \right)^2 / r - FC$	SC/gl	$\frac{C.M._r}{C.M._E}$	$\frac{C.M._r}{C.M._E}$
Error	(t - 1)(r - 1)	T-(t + r)	SC/gl		

4.5. Mediciones experimentales

4.5.1. En la materia prima

Se realizaron análisis proximales tomando muestras al azar del píceo y estipe del hongo *Lentinula edodes*, fueron analizados en el laboratorio de Bromatología del Departamento de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar:

Humedad:

Se procedió con la técnica determinada por la norma (AOAC 925.10).

Cenizas:

La medición de los valores de cenizas en los hongos utilizados en la investigación; se efectuó con la técnica determinada por la norma (AOAC 923.03).

Fibra:

Se determinó la fibra presente en el Píceo y Estipe por la norma INEN 522

Grasa:

La medición de los valores de cenizas en los hongos utilizados en la investigación; se efectuó con la técnica determinada por la norma NTE INEN-ISO11085.

Contenido de Proteína en el hongo (CPH)

Se procedió a determinar la proteína del píleo y estipe del hongo seco, por medio de la metodología determinada por (AOAC 990.03). El factor de conversión de nitrógeno a contenido de proteína fue de 4.38 (Yang *et al.*, 2001).

4.5.2. En los extractos del *Lentinula edodes* (píleo y estipe)

Los extractos obtenidos de los diferentes tratamientos fueron medidos en relación a su volumen y utilizados para evaluar su sensibilidad in vitro frente a bacterias patógenas.

Volumen de los extractos

El volumen final de los fluidos filtrados fue medido utilizando una probeta graduada

Actividad antimicrobiana (medición de los halos de inhibición)

La actividad antibacteriana de los extractos obtenidos del *Lentinula edodes* se evaluó siguiendo la metodología de difusión en agar (antibiograma de disco) descrito por Bauer *et al.*, (1966), que permite medir la susceptibilidad in Vitro de microorganismos patógenos y fitopatógenos frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias desconocidas de origen vegetal o fúngico con potencial antimicrobiano (Jurado et al. 2014)

4.6. Manejo del Experimento

4.6.1. Siembra y recolección de hongos

Se utilizaron residuos como: aserrín, bagazo de caña, cascarilla de arroz y salvado de trigo. Los materiales secos fueron picados e hidratados por un tiempo aproximado de 8-12 horas, hasta alcanzar una humedad de 70-75 %. Se escurrió el exceso de agua y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 45 min.

La siembra se la realizó en la cámara de flujo laminar utilizando fundas de polietileno transparente de 40 x 60 cm, inoculando el 4 % de semilla de *Lentinula* en relación al sustrato húmedo. Se perforaron las bolsas en forma longitudinal y en el fondo. Posteriormente se comprimió el sustrato cerrando las bolsas con hilo plástico. Las bolsas inoculadas fueron colocadas en un cuarto oscuro a la temperatura ambiente, se realizaron monitoreos permanentes, registrando la temperatura y la humedad relativa. Cuando los sustratos estuvieron completamente colonizados (coloración blanco algodonosa), se los trasladaron al área de fructificación. La cosecha de los hongos se realizó con la ayuda de una navaja estéril.

4.6.2. Obtención de Extractos

Las setas del hongo *Lentinula edodes* fueron deshidratadas a temperatura ambiente, separándolas en dos partes; estipe y píleo, para su posterior pulverizado. Se pesó 15 gramos de hongo por cada 100 mL de cada uno de los disolventes (cloroformo, etanol, acetato de etilo, y solución de 50% agua + 50% etanol).

Utilizando el método COSE (maceración en frío), el hongo y el disolvente se envasaron en frascos ámbar de vidrio los cuáles fueron almacenados en un lugar libre de la luz, por un periodo de 6 días. Se realizó una agitación diaria para homogenizar el extracto.

Con el objetivo de separar el fluido de los sólidos presentes en los extractos macerados, se colocaron las muestras en tubos para luego centrifugarlos a 8000 rpm a una temperatura de 10°C por 20 min. Los extractos centrifugados fueron tamizados utilizando papel filtro para luego almacenarlos en refrigeración en frascos ámbar de vidrio (Figura N°14).

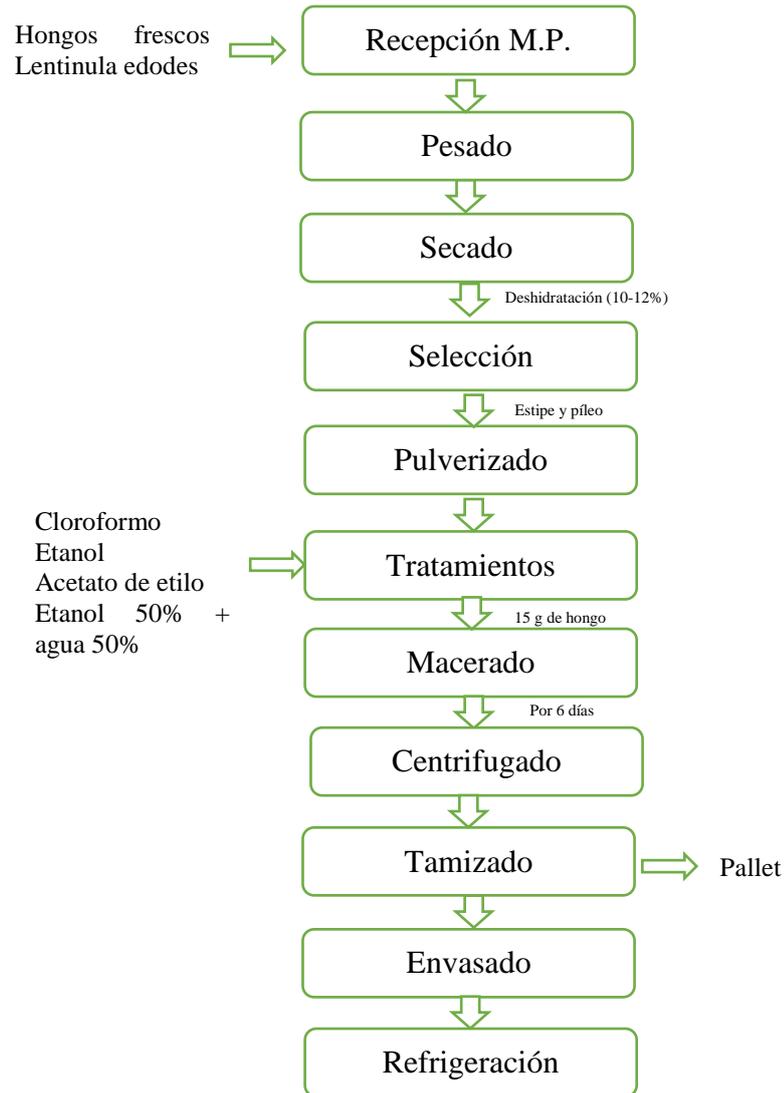


Figura N°14. Diagrama de flujo de la elaboración de extractos a partir del Lentinula edodes

4.6.3. Preparación del Inoculo

Se utilizaron 3 tipos de bacterias: *E. coli*, *Listeria spp*, *salmonella spp*, aisladas de carne de res y de cerdo procedente de las ternenas del mercado 10 de Noviembre de la ciudad de Guaranda; esta actividad se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Departamento de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó Nutrient Agar de la marca Oxoid, (29.4 g/L de agua destilada). Para el cultivo de *Listeria spp* se utilizó Chromognric Listera Agar de la marca Acumedia, (28g/L de agua destilada) con Bactor Agar como gelificante (10 g/L de agua). Y para el cultivo de *Salmonella spp* se utilizó XLD Agar de la marca Acumedia, (39 g/L de agua destilada). Todas estas bacterias fueron inoculadas dentro de la cámara de flujo laminar con la técnica de estriado e incubadas a 37 °C por 24 horas, de éstas bacterias (cultivo puro) se seleccionaron de 3 a 4 colonias, las cuáles se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución salina al 1%, se homogenizó con la ayuda de un agitador vórtex hasta obtener una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 Mc Farland (1.5 x 10⁶ UFC/mL).

4.6.4. Antibiograma de Disco (técnica de Kirby-Bauer)

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se realizaron a través del Método descrito por Kirby-Bauer, utilizando Agar Müeller-Hinton de la marca Acumedia. Los medios de cultivo se prepararon con 38 gramos de Agar Müeller-Hinton por cada litro de agua destilada (especificaciones de la etiqueta), la solución fue sometida a ebullición de 3 a 5 min hasta su completa dilución, después se la esterilizó en la autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos, se dejó reposar a una temperatura entre los 48 y 50 °C, distribuyéndolo en una cantidad aproximada de entre 25-30 cm³ en cajas de Petri estériles dentro de la cámara de flujo laminar.

Con la finalidad que no existan gotas de agua de condensación sobre la superficie del medio solidificado o bajo las tapas de las cajas Petri, se enfrió a 35 °C aproximadamente antes de colocarle la tapa

4.6.4.1. Preparación de los discos para realizar el antibiograma

En tubos eppendorf estériles, se colocaron 1 cm³ de la muestra de extracto (preparados para cada tratamiento). En los tubos con el extracto, se adicionó los discos en blanco (Oxoid Ltd.) (antimicrobial susceptibility test discs) dejando reposar por 15 min.

4.6.4.2. Inoculación e incubación de la muestra

Dentro del tubo de ensayo que contenía la suspensión del microorganismo en estudio, se sumergió un aplicador de algodón estéril y se procedió a realizar la siembra en tres direcciones por agotamiento y estrías sobre el agar Müller Hinton, se dejó el en reposo el medio sembrado durante 5 a 10 min manteniendo la caja con la tapa cerrada. Los discos en blanco humedecidos con el extracto se colocaron sobre la superficie del agar con pinzas estériles, 4 discos en la periferia dejando entre disco y disco un espacio uniforme (aproximadamente de 3 cm.); para evitar que las zonas de inhibición queden superpuestas, con las pinzas se presionó los discos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto uniforme. Los discos con antibióticos (penicilina y ciprofloxacina) se colocaron en la parte central como control positivo. Las cajas inoculadas ya con los discos fueron incubadas a 37° C, leyéndolas después de las 18 y 24 horas de su incubación.

4.6.4.3. Medición de los halos de inhibición

De cada caja se midió en milímetros el diámetro del halo de inhibición incluyendo el disco, con la ayuda de un calibrador Pie de Rey, a este resultado se le resta el tamaño del disco (6mm). Todos los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron por triplicado.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la composición físico-química del hongo *Lentinula edodes*

Los valores promedios de los análisis de humedad, ceniza, proteína, fibra cruda y grasa de las dos partes representativas del hongo *Lentinula edodes*, están descritos en la Tabla N°6,

Tabla N° 6. Valores promedios y desviación estándar de la composición de las partes representativas del *L. edodes* en base seca.

Muestra	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Fibra cruda
Estipe <i>L. edodes</i>	10.2% (0.91)	7.9% (0.79)	19.7% (0.98)	1.4% (0.12)	22.8% (1.20)
Píleo <i>L. edodes</i>	11% (0.82)	5.3% (0.37)	24.2% (0.44)	2.3% (0.16)	6.7% (0.21)

Los porcentajes corresponden al promedio de tres repeticiones. Valores entre () representan la desviación estándar.

Fuente: Departamento de Investigación Laboratorio de Bromatología-UEB, 2018

En la Tabla N° 6 se observa que en la humedad y contenido de grasa hay poca variación, no así para las cenizas que resultaron más altas para el estipe (7,9 %), la proteína para el píleo (24,2 %) y la fibra para el estipe (22,8 %). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Bisen *et al.*, (2010), quienes determinaron la composición proximal del píleo del hongo reportando valores para la proteína de 22.8 %, grasa 2.3 %, fibra 8.4 %, mientras que la humedad fue más baja (4.7 %). Así mismo Zhang *et al.*, (2013) quienes analizaron el estipe del hongo reportaron una humedad de 5.2 %, cenizas 9.8 %, proteína 16.2 %, grasa 1.37 % y para la fibra 38 %, valor más alto al encontrado en la presente investigación (Figura N° 15).

Jiang *et al.*, (2010) indican que las partes del hongo son muy diferentes en su composición química y que el estipe tiene una mayor fracción de fibra cruda insoluble (alrededor de 38 g/100 g) que el píleo (7.2 g/100 g), así mismo Zhang *et al.*, (2013) reportaron en su investigación que el contenido de proteína en el estipe (7.20 g/100 g) era mucho menor que en el píleo (18.29 g/100 g). Las diferencias en los resultados de las investigaciones reportadas pueden deberse al tipo de cepa empleado y a los métodos de análisis

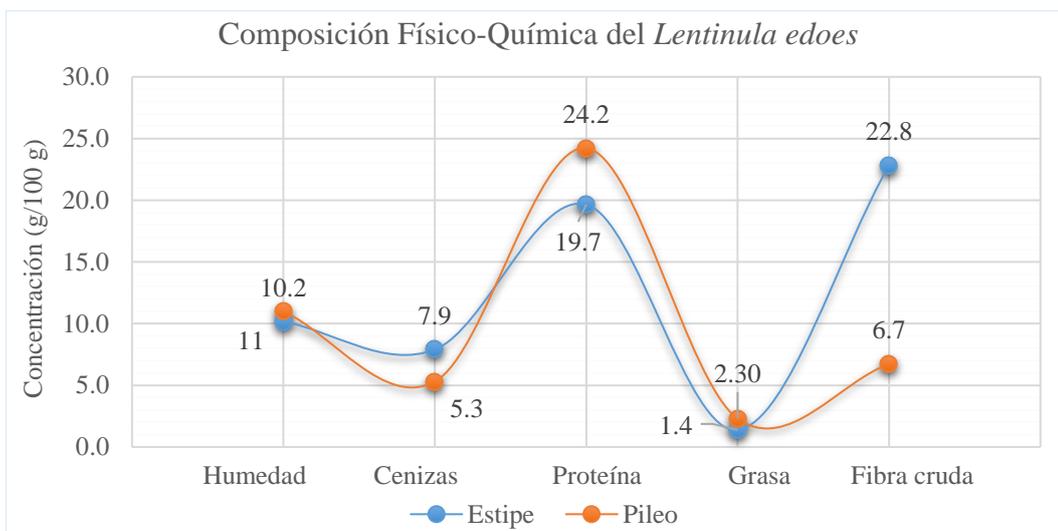


Figura N°15. Composición físico-química del píleo y estipe del hongo *Lentinula edodes*

5.1.1. Obtención de extractos del hongo utilizando diferentes solventes

En este estudio, la extracción tanto del estipe como del píleo se realizó utilizando cuatro disolventes de polaridad creciente.

5.1.1.1. Volumen final de los extractos utilizando diferentes disolventes

Se obtuvieron como resultados 24 extractos traslúcidos sin partículas en suspensión. Los valores obtenidos de las mediciones experimentales de los volúmenes, realizadas al extracto del hongo (talo y del píleo) se presentan en la Tabla No.7

Tabla N° 7. Media del volumen (mL) de los extractos obtenidos en los diferentes tratamientos.

Extractos	Cloroformo	Etanol	A. de Etilo	Agua-Etanol 50%
Estipe <i>L. edodes</i>	67.3 (2.49)	62 (1.63)	64.3 (2.87)	60.3 (1.25)
Píleo <i>L. edodes</i>	62.3 (2.49)	57.3 (1.25)	60 (1.63)	52.7 (2.49)

Los volúmenes corresponden al promedio de tres repeticiones. Valores entre () representan la desviación estándar.

Fuente: Sanabria, (2018).

Para el análisis de los resultados del volumen obtenido se procedió a realizar la tabla de análisis de varianza (ADEVA) mediante la utilización del programa estadístico InfoStat como se detalla a continuación:

Tabla N° 8. Análisis de varianza (ADEVA) para volumen de los extractos del hongo

F.V	G.L	S.C	C.M	F	p - valor
Tratamientos	7	413.96	59.14	9.81	0.0002 **
Repeticiones	2	21.58	10.79	1.79	0.2032 NS
Error	14	84.42	6.03		
Total	23	519.96			
CV %	4.04				

**=Diferencia altamente significativa

*=Diferencia significativa

NS=Diferencia no significativa

En el Tabla N° 8, se muestra el análisis de varianza de la variable volumen de los extractos del hongo *Lentinula edodes* obtenidos con diferentes extractos (cloroformo, etanol, acetato de etilo, y agua + etanol 50%), en la que se observa que existen diferencia altamente significativa ($p < 0,05$) para los tratamientos. Diferencia que se puede deber a la polaridad de los disolventes y a la capacidad del hongo deshidratado de absorber y retener líquidos (Ruilova *et al.*, 2014). Los

resultados obtenidos concuerdan con la investigación realizada por Orozco (2004) quién evaluó los porcentajes de recuperación de distintos disolventes en la elaboración de extractos vegetales, determinando que cada solvente presenta características diferentes de rendimiento en el proceso de extracción. Así mismo Devi *et al.*, (2013), señala que el porcentaje de extracción depende de la polaridad y la naturaleza de los disolventes.

Con respecto a las repeticiones no existen diferencias significativas debido a la homogeneidad de las muestras.

Tabla N° 9. Prueba de Tukey al 5% de la variable volumen de los extractos.

Tratamientos	Medias	Rangos
1	67.03	a
3	64.33	a b
5	62.23	a b
2	62.00	a b
4	60.33	a b
7	60.00	a b
6	57.33	b
8	52.67	c

En la Tabla N° 9, se presenta la prueba de Tukey con un 95% de confianza, donde se observa que se forman 4 grupos, las medias que comparten letras no son significativamente diferentes entre sí (T3, T5, T2, T4 y T7), la media más alta correspondió al tratamiento T1 (67.03 mL), estipe de hongo más cloroformo. El mayor volumen podría deberse a que el estipe es fibroso pero no esponjoso como el púleo que tiene una mayor capacidad de absorción de líquido (Ruilova *et al.*, 2014) y al disolvente utilizado, ya que el cloroformo es miscible con una gran cantidad de compuestos orgánicos, es más pesado que el agua por lo que mejora el filtrado de la solución (Rojas *et al.* 2001). Por otra parte la media más baja correspondió al tratamiento T8 (52.67 mL), que corresponde a púleo más solución de etanol 50% + agua 50%, lo que podría obedecer a que el hongo tiene una gran capacidad de absorción y retención de agua haciendo difícil su filtrado (Ruilova *et al.*, 2014).

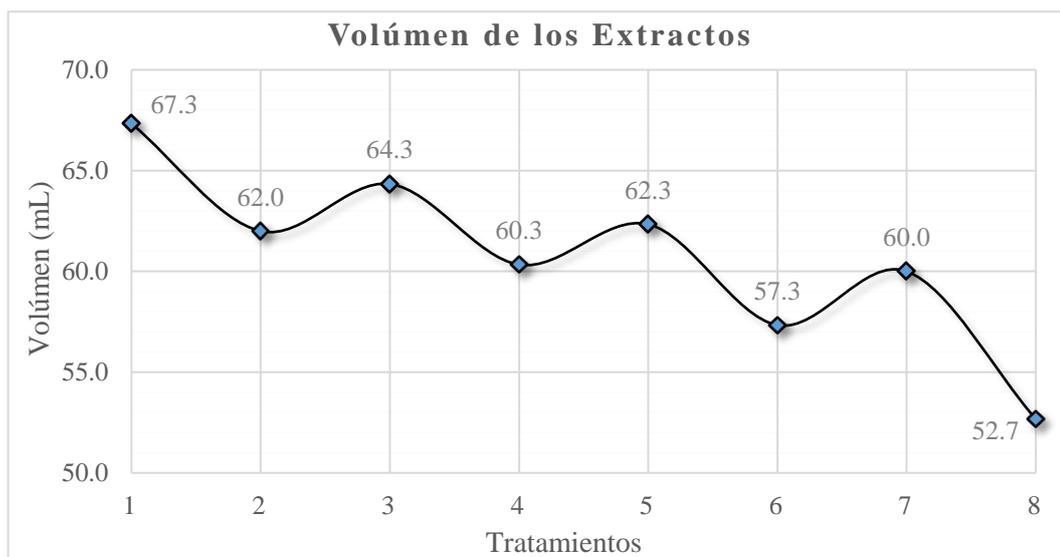


Figura N°16. Medias del volumen de los extractos

5.1.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes*, mediante la técnica de Kirby-Bauer frente a bacterias patógenas (*E. coli*, *salmonella spp* y *listeria spp*).

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del píleo y estipe del hongo *Lentinula edodes*, frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *salmonella spp* y *listeria spp*, se diseñó un experimento en el que se compara la capacidad de los extractos de inhibir el crecimiento de los microorganismos a través de la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana, usando Penicilina (P) y ciprofloxacina (C) como control positivo.

En la presente investigación, la capacidad antimicrobiana es medida a través del diámetro del halo de inhibición, el cual es afectado por dos factores: la parte del hongo (estipe y píleo) y el tipo de disolvente (cloroformo, etanol, acetato de etilo, agua + etanol 50%).

5.1.2.1. Sensibilidad de los extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes* frente a *listeria spp.*

Se evaluó la sensibilidad de la bacteria *listeria spp* frente a los cuatro extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes* y a dos antibióticos: ciprofloxacina y penicilina como control positivo, resultados que se detallan a continuación:

Tabla N° 10. Medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana de los extractos del hongo frente a la bacteria *Listeria spp.*

Extractos	Halos de inhibición de la bacteria <i>Listeria spp</i> (mm)			
	Cloroformo	Etanol	A. de Etilo	Agua-Etanol 50%
Estipe <i>L. edodes</i>	5.3 (0.94)	12.7 (0.94)	4 (0)	8.7 (0.47)
Píleo <i>L. edodes</i>	4.7 (0.47)	10 (0)	3.7 (0.47)	8 (0)

Las medidas de los halos de inhibición corresponden al promedio de tres repeticiones. Valores entre () representan la desviación estándar.

Para el análisis de los resultados del diámetro de los halos de inhibición de la bacteria *Listeria spp* frente a los extractos del hongo *L. edodes*, se procedió a realizar la tabla de análisis de varianza mediante la utilización del programa estadístico InfoStat como se detalla a continuación:

Tabla N° 11. Análisis de varianza (ADEVA) para los resultados experimentales del diámetro de los halos de inhibición de los extractos en el crecimiento de *Listeria spp.*

F.V	G.L	S.C	C.M	F	p - valor
Tratamientos	7	219.29	31.33	86.28	<0.0001**
Repeticiones	2	2.25	1.13	3.10	0.0769NS
Error	14	5.08	0.36		
Total	23	226.63			
CV %	8.46				

En el Tabla N° 11, se muestra el análisis de varianza de la variable diámetro de los halos de inhibición de la *Listeria spp* frente a los extractos del hongo *Lentinula edodes* obtenidos con diferentes disolventes (cloroformo, etanol, acetato de etilo, y agua + etanol 50%), en la que se observa que existen diferencia altamente significativa ($p < 0.05$) para los tratamientos con el 95% de confianza. Diferencia puede deberse a la capacidad que tienen los solventes para extraer sustancias con actividad antimicrobiana del hongo pulverizado. Los resultados obtenidos concuerdan con la investigación realizada por Lapornik *el al.*, (2005) quienes compararon extractos preparados a partir de subproductos vegetales utilizando diferentes disolventes y tiempo de extracción, determinando que el tipo de solvente influye en la extracción de los componentes activos.

Con respecto a las repeticiones no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) debido a la homogeneidad de las muestras

Tabla N° 12. Comparación según Tukey al 5% de las medidas de los tratamientos de la variable medición del diámetro de los halos de inhibición de *Listeria*

Tratamientos	Medias	Rangos
2	12.7	a
6	10.0	b
4	8.7	b c
8	8.0	c
1	5.3	d
5	4.7	d
3	4.0	d
7	3.7	d

En la Tabla N° 12, se presenta la prueba de Tukey con un 95 % de confianza a los para los promedios de los tratamientos, en donde se observa 4 grupos diferentes, las medias que comparten letras no son significativamente diferentes (T4), la media más alta correspondió al tratamiento T2 (12.7 mm), es decir el estipe del hongo más etanol, que presentó el mayor efecto inhibitorio, seguido por el píleo más etanol (10 mm). Resultados que podrían deberse a la solubilidad del etanol y otros alcoholes en compuestos orgánicos, mejorando el proceso de extracción de compuestos

activos (Lapornik et al. 2005). Por otra parte la media más baja correspondió al tratamiento T7 (3.7 mm), que corresponde al pñleo más acetato de etilo, lo que podría obedecer a la volatilidad del extracto de acetato en el disco.

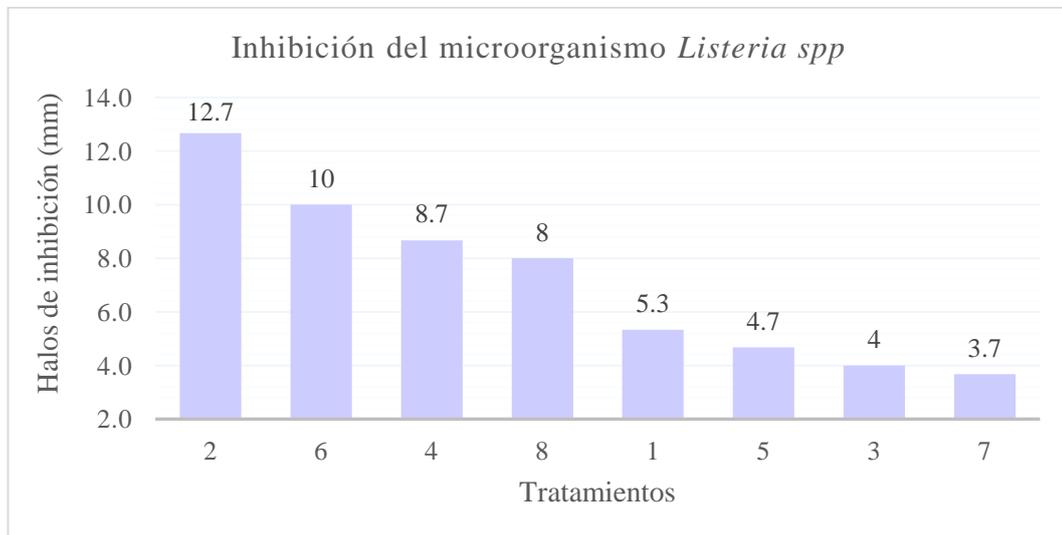


Figura N°17. Valores medios del diámetros de los halos de inhibición de los tratamientos con diferentes extractos frente a *Listeria spp*

En la Figura N° 17 se puede observar que el T2 correspondiente al extracto etanólico del estipe, que mostró una actividad más fuerte con halo de inhibición (12.7 mm) frente a la bacteria *Listeria spp*, estudio concordante con Van Ba *et al.*, (2017), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana del *Lentinula edodes* frente a bacterias patógenas, reportando que los extractos etanólicos y acuosos inhibían en el crecimiento de la *Listeria monocytogenes*. Van Ba *et al.*, (2016) también reportaron que las muestras con extracto etanólico mostraron una actividad inhibitoria mayor frente a la *listeria*. Por otra parte Hearst *et al.*, (2009) evaluaron extractos etanólicos del *Lentinula edodes* frente a *listeria monocytogenes* y obtuvieron 11 mm de halo de inhibición, resultado menor al encontrado en la presente investigación.

La sensibilidad de la *listeria spp* al extracto del hongo se relaciona con el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en: resistentes ($d < 8$ mm.), sensibles

(9 mm. < d < 14 mm.), muy sensibles (14 mm.< d < 19 mm.) y extremadamente sensibles (d > 20mm.) (Hearst et al. 2009, Ponce et al. 2008). De acuerdo a esta referencia bibliográfica y basándose en los resultados del diámetro de los halos de inhibición, la bacteria Gram positiva *Listeria spp* es sensible a los extractos etanólicos del hongo *Lentinula edodes*. Estos extractos obtenidos a partir del hongo tienen mayor sensibilidad que la ciprofloxacina (1 mm), pero menor que la penicilina (15.3 mm).

5.1.2.2. Sensibilidad de los extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes* frente a *Salmonella spp*.

Se evaluó la sensibilidad de la bacteria *Salmonella spp* frente a los cuatro extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes* y a dos antibióticos: ciprofloxacina y penicilina como control positivo, resultados que se detallan a continuación:

Tabla N° 13. Medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana de los extractos del hongo frente a la bacteria *Salmonella spp*.

Extractos	Halos de inhibición de la bacteria <i>Salmonella spp</i> (mm)			
	Cloroformo	Etanol	A. de Etilo	Agua-Etanol 50%
Estipe <i>L. edodes</i>	6.0 (1.63)	9.3 (0.47)	4.3 (0.47)	7.0 (0.94)
Píleo <i>L. edodes</i>	5.3 (0.94)	7.7 (0.47)	3.3 (0.47)	6 (0)

Las medidas de los halos de inhibición corresponden al promedio de tres repeticiones. Valores entre () representan la desviación estándar.

Para el análisis de los resultados de los halos de inhibición de la bacteria *salmonella spp* frente a los extractos del hongo *L. edodes*, se procedió a realizar la tabla de análisis de varianza que se detalla a continuación:

Tabla N° 14. Análisis de varianza (ADEVA) para los resultados experimentales del diámetro de halos de inhibición de los extractos en el crecimiento de *Salmonella spp*

F.V	G.L	S.C	C.M	F	p - valor
Tratamientos	7	75.29	10.39	9.98	0.0002 **
Repeticiones	2	0.25	0.13	0.12	0.8913 NS
Error	14	15.08	1.08		
Total	23	90.63			
CV %	16.95				

En el Tabla N° 14, se muestra el análisis de varianza de la variable diámetro de los halos de inhibición de la *Salmonella spp* frente a los extractos del hongo *Lentinula edodes* obtenidos con diferentes disolventes (cloroformo, etanol, acetato de etilo, y agua + etanol 50 %), en la que se observa que con el 95 % de confianza existen diferencias altamente significativas ($p < 0.05$) para los tratamientos. Resultados que pueden deberse a la capacidad que tienen los disolventes para extraer sustancias con actividad antimicrobiana del hongo pulverizado y a la parte del hongo utilizada. Los resultados obtenidos concuerdan con la investigación realizada por Van Ba *et al.*, (2016) quienes reportaron que el tipo de disolvente usado para la obtención de extractos afecta significativamente la actividad antimicrobiana. Con respecto a las repeticiones no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) debido a la homogeneidad de las muestras

Tabla N° 15. Comparación según Tukey al 5% de las medidas de los tratamientos de la variable medida del diámetro de halos de inhibición de *Salmonella spp*.

Tratamientos	Medias	Rangos
2	9.3	a
6	7.6	b
4	7.0	b
8	6.0	c
1	6.0	c
5	5.3	c d
3	4.3	c d
7	3.3	d

En la Tabla N° 15, al aplicar la prueba de Tukey con un 95% de confianza, se observa que se forman 5 grupos. La media más alta correspondió al tratamiento T2 (9.3 mm), conformado por el estipe de hongo más etanol y la más baja T7 (3.3 mm), que corresponde al píceo más acetato de etilo. El mayor o menor efecto inhibitorio podría deberse a la diferente solubilidad de los disolventes en compuestos orgánicos (Lapornik et al. 2005).

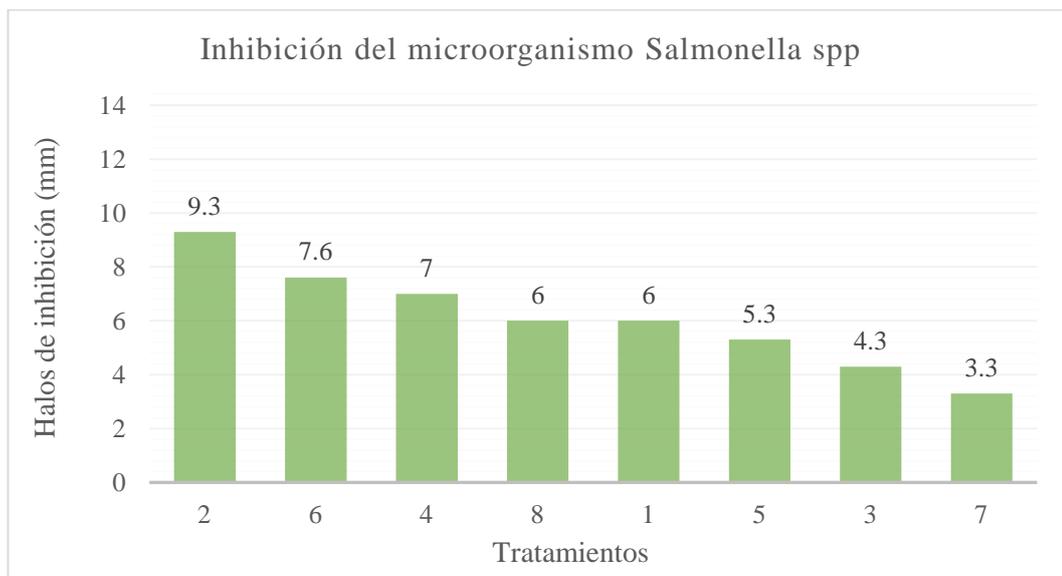


Figura N°18. Medias de los halos de inhibición de los tratamientos para *Salmonella spp*

En la Figura N° 18 se puede observar que el T2 correspondiente al extracto etanólico del estipe, mostró una actividad mayor con halo de inhibición (9.3 mm) frente a la bacteria *salmonella spp*, estudio concordante con Hearst *et al.*, (2009) quienes evaluaron extractos etanólicos del *Lentinula edodes* frente a *salmonella* obteniendo 9 mm de halo de inhibición.

Según, Hearst *et al.*, (2009) y Ponce *et al.*, (2008) y basándose en los resultados del diámetro de los halos de inhibición, la bacteria Gram negativa *Salmonella spp* es sensible a los extractos etanólicos del hongo *Lentinula edodes*, estos extractos tuvieron mayor inhibición en el crecimiento de esta bacteria que la penicilina (1 mm), pero menor que la ciprofloxacina (24 mm).

5.1.2.3. Sensibilidad de los extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes* frente a *Escherichia coli*.

Se evaluó la sensibilidad de la bacteria *E. coli* frente a los cuatro extractos obtenidos a partir del hongo *Lentinula edodes* y a dos antibióticos: ciprofloxacina y penicilina como control positivo, resultados que se detallan a continuación:

Tabla N° 16. Medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana de los extractos del hongo frente a la bacteria *Escherichia coli*.

Extractos	Halos de inhibición de la bacteria <i>Escherichia coli</i> (mm)			
	Cloroformo	Etanol	A. de Etilo	Agua-Etanol 50%
Estipe <i>L. edodes</i>	3.3 (0.47)	8.0 (0)	4.3 (0.47)	7.0 (0)
Píleo <i>L. edodes</i>	2.7 (0.47)	6.7 (0.94)	4.0 (0)	6.3 (0.47)

Para el análisis de los resultados de los halos de inhibición de la bacteria *E. coli* frente a los extractos del hongo *L. edodes*, se procedió a realizar el análisis de varianza (Tabla N° 17).

Tabla N° 17. Análisis de varianza (ADEVA) para los resultados experimentales de halos de inhibición de los extractos en el crecimiento de *E. coli*.

F.V	G.L	S.C	C.M	F	p - valor
Tratamientos	7	79.63	11.38	31.85	<0.0001**
Repeticiones	2	0.33	0.17	0.47	0.6365 NS
Error	14	5.0	0.36		
Total	23	84.96			
CV %	11.29				

En el Tabla N° 17, se muestra el análisis de varianza de la variable diámetro de los halos de inhibición de la *E.coli* frente a los extractos del hongo *Lentinula edodes* obtenidos con diferentes extractos (cloroformo, etanol, acetato de etilo, y agua +

etanol 50%), en la que se observa que con el 95% de confianza existen diferencia altamente significativa ($p < 0.05$) para los tratamientos. Diferencia que puede deberse a la capacidad que tienen los solventes para extraer sustancias con actividad antimicrobiana del hongo pulverizado y a la parte del hongo utilizada. Con respecto a las repeticiones no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) debido a la homogeneidad de las muestras

Tabla N° 18. Comparación según Tukey al 5% de las medidas de los tratamientos de la variable medición de halos de inhibición de *E. coli*

Tratamientos	Medias	Rangos
2	8.0	a
4	7.0	a b
6	6.7	a b
8	6.3	b
3	4.3	b
7	4.0	b
1	3.3	c
5	2.7	c

En la Tabla N° 18, se evalúa la prueba de Tukey con un 95% de confianza, a los promedios de los tratamientos, en donde se observa 4 grupos, las medias que comparten letras no son significativamente diferentes (T4, T6) la media más alta correspondió al tratamiento T2 (8.0 mm), es decir: estipe de hongo más etanol. Que presente el mayor efecto inhibitorio podría deberse a que el estipe del hongo *Lentinula edodes* contiene mayor cantidad de compuestos activos que el píceo (Yen y Mau, 2007). Por otra parte la media más baja correspondió al tratamiento T5 (2.7 mm), que corresponde al píceo más cloroformo.

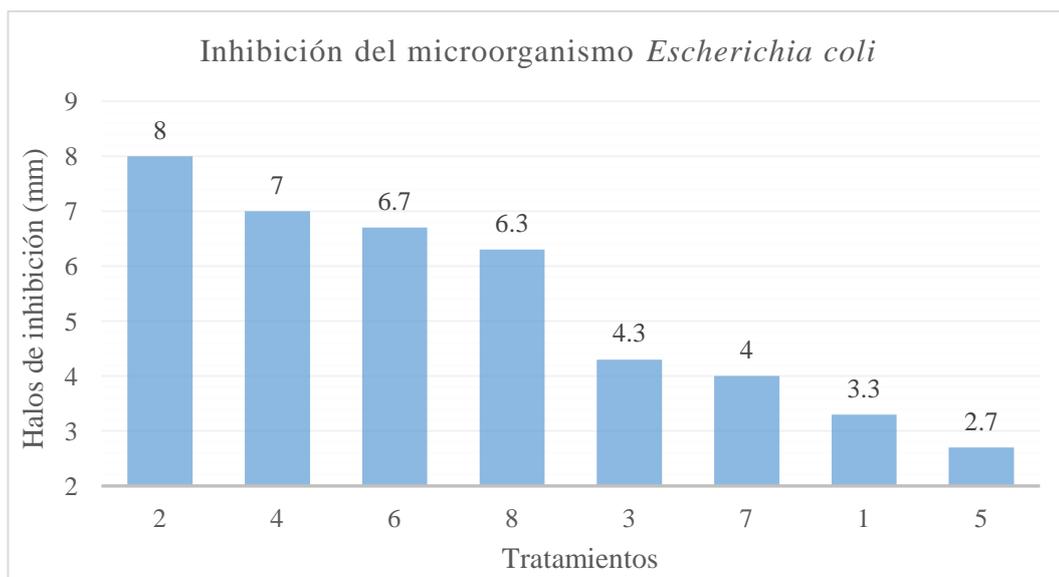


Figura N°19. Medias de los halos de inhibición de los tratamientos para *E.coli*

En la Figura N°19, se puede observar que el T2 correspondiente al extracto etanólico del estipe, mostró una mayor actividad con halo de inhibición (8 mm) frente a la bacteria *E. coli*, estudio concordante con Van Ba *et al.*, (2017), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana del *Lentinula edodes* frente a bacterias patógenas, reportando que los extractos etanólicos y acuosos inhibían el crecimiento de la *Escherichia coli*. Así mismo Van Ba *et al.*, (2016) quienes reportaron que las muestras con extracto etanólico mostraron una actividad inhibitoria mayor frente a la *E. coli*.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son menores a los reportados por Hearst *et al.*, (2009) quienes evaluaron extractos acuosos concentrados del *Lentinula edodes* frente a *Escherichia coli* obteniendo 10 mm de halo de inhibición.

La sensibilidad de la *Escherichia coli* al extracto del hongo se relaciona con el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. De acuerdo Hearst *et al.*, (2009) y Ponce *et al.*, (2008) y basándose en los resultados del diámetro de los halos de inhibición, la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* no es sensible a los extractos del hongo *Lentinula edodes*. Sin embargo estos extractos tienen mayor sensibilidad que la penicilina (0 mm), pero menor que la ciprofloxacina (25 mm)

Tabla N° 19. Resumen de la sensibilidad de las bacterias a los extractos del *Lentinula edodes*

Extractos	<i>Listeria spp</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>E. coli</i>
Estipe + Cloroformo	-	-	-
Estipe + Etanol	+	+	-
Estipe + Acetato de Etilo	-	-	-
Estipe + etanol + agua 50%	-	-	-
Píleo + cloroformo	-	-	-
Píleo + Etanol	+	-	-
Píleo + Acetato de Etilo	-	-	-
Píleo + etanol + agua 50%	-	-	-

(++) Muy sensibles (+) sensibles y (-) resistentes

Estos valores, son considerados como un punto de referencia que justifica continuar el estudio a fin de aislar, purificar y determinar la estructura química de los compuestos responsables del efecto antibacteriano. El hallazgo de nuevos agentes antibióticos, sean de fuentes naturales o sintéticas se ha convertido en una necesidad para la comunidad médica y científica en general.

CAPÍTULO VI

COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

6.1. Hipótesis

H₀ = Los extractos obtenidos a partir del estipe y píleo del hongo *Lentinula edodes* utilizando diferentes disolventes presentarán actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas.

H₁ = Los extractos obtenidos a partir del estipe y píleo del hongo *Lentinula edodes* utilizando diferentes disolventes no presentarán actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas.

6.2. Análisis de comprobación de la hipótesis

De acuerdo al análisis y discusión de los resultados de cada una de las variables en estudio, se llegó a comprobar que los extractos del estipe y píleo del hongo *Lentinula edodes* obtenidos utilizando diferentes solventes, si tienen efectos inhibitorios en mayor o menor grado de actividad frente a bacterias patógenas: *Listeria spp*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli*. Por lo tanto; se acepta la hipótesis nula y se rechaza la Hipótesis alterna con un nivel de significancia del 5 %.

Se demuestra, que la parte del hongo y el tipo de disolvente utilizado, influyen en el tamaño del halo de inhibición.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

El píleo y estipe del hongo analizados en su composición físico - química, presentaron poca variación en su contenido de humedad, mayor contenido de cenizas para el estipe (7.9 g/100g). La proteína fue más alto para el píleo (24.2 g/100g), mientras que la fibra fue mayor para el estipe (22.8 g/100g). El porcentaje de grasa en este tipo de hongos es relativamente bajo, menor al 3 %.

De los extractos obtenidos a partir del estipe y píleo del hongo *Lentinula edodes* utilizando los diferente disolventes, el que presentó mayor rendimiento en volumen obtenido fue el T1 (67 mL) (estipe + cloroformo) y el valor más bajo correspondió al T8 (52.7 mL) (píleo + acetato de etilo). Concluyéndose que este resultado puede deberse al contenido fibroso del estipe en contraste con el píleo que por su estructura esponjosa tiene una mayor capacidad de absorción de líquidos.

Se determinó que el extracto formado por el estipe + etanol (T2), fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana frente a la bacteria Gram positiva *Listeria spp*, con un halo de inhibición de 12.7 mm, para la bacteria Gram negativa *Salmonella spp* con un halo de inhibición de 9.3 mm y para la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, con un halo de inhibición de 8 mm. Así mismo para el píleo + etanol (T6) obtuvo un halo de inhibición de 10 mm para la bacteria *Listeria spp*.

El extracto con menor actividad antimicrobiana fue el T7 (píleo + acetato de etilo), para la bacteria *Listeria* con un halo de inhibición de (3.7), para *Salmonella* (3.3 mm) y para la *E. coli* de 2.7 mm en el extracto píleo + cloroformo (T5).

La sensibilidad de las bacterias en los extractos del hongo *Lentinula edodes* obtenidos con diferentes disolventes, se relaciona con el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. De acuerdo a Hearst *et al.*, (2009) y Ponce *et*

al., (2008) y basándose en los resultados del diámetro de los halos de inhibición ($9 \text{ mm} < d < 14 \text{ mm}$.), las bacterias Gram positiva *Listeria spp* y Gram negativa *Salmonella spp* son sensible a los extractos etanólicos del hongo *Lentinula edodes*, alcanzando un halo de inhibición de 12.7 mm y 9.3 mm respectivamente. Sin embargo la bacteria *E. coli* es resistente a los extractos obtenidos a partir de este hongo.

Según la escala de sensibilidad ($14 \text{ mm} < d < 19 \text{ mm}$) citada por Hearst *et al.*, (2009), se comprobó que la bacteria gran positiva *Listeria spp* es muy sensible a la penicilina (control positivo) ya que presentó un halo de 15.3 mm, pero resistente ($d < 8 \text{ mm}$) a la ciprofloxacina (control positivo) con un halo de inhibición de 1 mm. Mientras que las bacterias *Salmonella spp* y *E. coli* son extremadamente sensibles ($d > 20 \text{ mm}$.) a la ciprofloxacina, por los halos de inhibición de (24 mm y 25 mm) respectivamente), sin embargo son resistentes a la penicilina obteniendo halos menores a 2 mm.

Se concluye que cada disolvente presenta características diferentes de rendimiento y capacidad de extraer sustancias con actividad antimicrobiana, debido a factores como la polaridad y solubilidad de los disolventes en los compuestos orgánicos, presentando mejores características de extracción el etanol. Además la parte del hongo también influye en el rendimiento y capacidad e inhibición del crecimiento bacteriano resultando el estipe como la parte más influyente.

7.2. Recomendaciones

Utilizar métodos validados para el análisis para los diferentes compuestos para que los resultados sean confiables y no interfieran con ningún sesgo de error en la interpretación de los resultados de la investigación

Los disolventes orgánicos utilizados para la obtención de extractos deben manejarse con cuidado ya que son volátiles (se evaporan rápidamente) e inflamables.

La maceración en frío para la obtención de extractos debe combinarse con un proceso de evaporación y concentración (puede usarse el rotavapor) para aumentar el efecto antimicrobiano.

Las bacterias a utilizarse para el antibiograma de discos deben ser frescas, no utilizar bacterias de varios días de reactivación.

Probar la eficiencia antimicrobiana del extracto del estipe del hongo *Lentinula edodes* sobre alimentos procesados como: (lácteos, cárnicos, bebidas, etc.) de consumo directo.

BIBLIOGRAFÍA

Akirama, Y; Yao, L; Changs, D. 1981. Immunological Characteristics of anti-tumor polysaccharides lentinan and tis analogues, as immune adjuvant. *Excerpta Medica* 1981: 576.

AOAC, (Association of Official Agricultural Chemists). 1980. *Official Methods of Analysis*. 14 th edit Washington D.C., USA, s.e., 3-36.

AOAC 990.03, (Association of Official Agricultural Chemists). 2005. *Official Methods of Analysis*. Dumas method. 15 th edit Washington D.C., USA, s.e., 5-8.

Azmir, J; Zaidul, ISM; Rahman, MM; Sharif, KM; Mohamed, A; Sahena, F; Jahurul, MHA; Ghafoor, K; Norulaini, NAN; Omar, AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117(4): 426-436.

Van Ba, H; Seo, H-W; Cho, S-H; Kim, Y-S; Kim, J-H; Ham, J-S; Park, BY; Pil Nam, S. 2016. Antioxidant and anti-foodborne bacteria activities of shiitake by-product extract in fermented sausages. *Food Control* 70: 201-209.

Van Ba, H; Seo, HW; Cho, SH; Kim, YS; Kim, JH; Ham, JS; Park, BY; Pil-Nam, S. 2017. Effects of extraction methods of shiitake by-products on their antioxidant and antimicrobial activities in fermented sausages during storage. *Food Control* 79: 109-118.

Barrera, A; Morelos, P; Roo, Q. 2011. *Los Macromicetos del Jardín Botánico de ECOSUR. sexta México DC.- Mexico, Colección Corredor Biológico Mesoamericano México*, 112.

Barros, L; Calhella, RC; Vaz, JA; Ferreira, ICFR; Baptista, P; Estevinho, LM. 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild

edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology* 225(2): 151-156.

Bauer, AW; Kirby, WM; Sherris, JC; Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology* 45(4): 493-6.

Bisen, PS; Baghel, RK; Sanodiya, BS; Thakur, GS; Prasad, GBKS. 2010. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry* 17(22): 2419-2430.

Boa, E. 2005. Los hongos silvestres comestibles: Perspectiva global de su uso e importancia para la población. Ed. FAO. Roma, Vaile delle Terme, 163.

Books, G; Butel, J; Morse, S. 2005. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick, Adelberg*. 18a Edició s.l., Manual Moderno, 72-78.

Breene, WM. 1990. Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms. *Journal of Food Protection* 53(10): 883-899.

Brunner, G. 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* 67(1-2): 21-33.

Cabrera, R; Valenzuela, S; Elisa, M; Reyes, Y; Esqueda, M; Assaff, A. 2013. Characterization of methanolic extracts of vineyard pruning and wheat straw and its oxidation by extracellular enzymes from *Lentinula edodes* Abstract. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo 2013.

Çağlarirmak, N. 2007. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry* 105(3): 1188-1194.

- Casari, KBPB; Kasuya, MCM; Vanetti, MCD. 2011. Antimicrobial activity and mineral composition of shiitake mushrooms cultivated on agricultural waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54(5): 991-1002.
- Cercenado, E; Saavedra, J. 2009. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada* 7(4): 214-217.
- Chang, S-T. 2008. Overview of Mushroom Cultivation and Utilization as Functional Foods. *Mushrooms as Functional Foods*. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., p.1-33.
- Chibata, I; Okumura, K; Takeyama, S; Kotera, K. 1969. Lentinacin: a new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. *Experientia* 25(12): 1237-1238.
- Chihara, G. 1993. Aspectos médico del Lentinan aislado del *L. edodes*. *Cancer Reserch* 1993: 114-116.
- Chihara, G; Hamuro, J; Maeda, YY; Shio, T; Suga, T; Takasuka, N; Sasaki, T. 1987. Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview. *Cancer detection and prevention. Supplement : official publication of the International Society for Preventive Oncology, Inc* 1: 423-43.
- Contessa, CR; Souza, NB; Manera, AP; Moraes, CC. 2016. Extração e purificação de antimicrobiano do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*. *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos* 4: 1-7.
- Devi, WR; Singh, SB; Singh, CB. 2013. Antioxidant and anti-dermatophytic properties leaf and stem bark of *Xylosma longifolium* clos. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013: 4-6.

- Ding, X; Xie, N; Zhao, S; Wu, Y; Li, J; Wang, Z. 2015. Simultaneous determination of ten preservatives in ten kinds of foods by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry* 181: 207-214.
- Enman, J; Hodge, D; Berglund, KA; Rova, U. 2008. Production of the bioactive compound eritadenine by submerged cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(8): 2609-2612.
- Enman, J; Rova, U; Berglund, K. 2007. Quantification of the Bioactive Compound Eritadenine in Selected Strains of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Agric. Food Chemical* 55: 1177–1180.
- Fundazioa, FV para la SA-E-NESE. 2014. Patógenos en los Alimentos-Información Consumidor-Consumidor: Seguridad Alimentaria e Higiene. Consultado 21 mar. 2018. Disponible en http://www.elika.eus/consumidor/es/preguntas_patogenos.asp
- Gadea, R; Glibota, NP; Pérez, R; Gálvez, A; Ortega, E; Fernández, M; Pérez, R; Gálvez, A; Ortega, E; Glibota, NP; Pérez, R; Gálvez, A; Ortega, E. 2017. Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology* 63: 58-71.
- García, F. 2011. Brotes germinados y bacterias. *Revista de Libros* 2: 175-17.
- Gründemann, C; Garcia-Käufer, M; Sauer, B; Scheer, R; Merdivan, S; Bettin, P; Huber, R; Lindequist, U. 2015. Comparative chemical and biological investigations of β -glucan-containing products from shiitake mushrooms. *Journal of Functional Foods* 18: 692-702.
- Harborne, JB (Jeffrey B. 1998. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. s.l., Chapman and Hall, 302.

- Hassegawa, R; Megumi Kasuya, MC; Dantas Vanetti, MC. 2005. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(2): 94-99.
- Hearst, R; Nelson, D; McCollum, G; Millar, BC; Maeda, Y; Goldsmith, CE; Rooney, PJ; Loughrey, A; Rao, JR; Moore, JE. 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 15(1): 5-7.
- Hernández, P. 2010. Bacterias en los alimentos. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. 2010: 1-38.
- Hirasawa, M; Shouji, N; Neta, T; Fukushima, K; Takada, K. 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents* 11(2): 151-157.
- Izuka, H. 1997. Production of *Lentinus edodes* mycelia extract. *Food Reviews International* 1997.
- Jasinghe, VJ; Perera, CO. 2005. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation. *Food Chemistry* 92(3): 541-546.
- Jiang, T; Luo, Z; Ying, T. 2014. Fumigation with essential oils improves sensory quality and enhanced antioxidant ability of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Food Chemistry* 172: 692-698.
- Jiang, T; Wang, Q; Xu, S; Jahangir, MM; Ying, T. 2010. Structure and composition changes in the cell wall in relation to texture of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored in modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(5): n/a-n/a.

- Joyce, M; Woods, CW. 2004. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. *Infectious disease clinics of North America* 18(3): 401-34, vii.
- Jurado, F; Palou, E; López, A. 2014. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8(1): 68-78.
- Kitzberger, CSG; Smânia, A; Pedrosa, RC; Ferreira, SRS. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* 80(2): 631-638.
- Komemushi, S; Yamamoto, Y; Fujita, T. 1996. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. *Antibact Antifung Agents* 24: 21-25.
- Lapornik, B; Prošek, M; Wondra, AG. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71(2): 214-222.
- Lindequist, U; Niedermeyer, THJ; Jülich, W-D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2(3): 285-99.
- Lopez, A. 2016. *Manual de Producción de Micelio de Hongos Comestibles*. Veracruz, México, Instituto de Investigaciones Forestales, 15-23.
- Madigan, M; Martinko, J; Dunlap, P; Clark, D. 2009. *Brock Biology of microorganisms* 12th edn . ResearchGate no.July: 12-14.
- Maeda, YY; Chihara, G. 1973. The effects of neonatal thymectomy on the antitumour activity of lentinan, carboxymethylpachyman and zymosan,

and their effects on various immune responses. *International journal of cancer* 11(1): 153-61.

Maeda, YY; Chihara, G; Ishimura, K. 1974. Unique increase of serum proteins and action of antitumour polysaccharides. *Nature* 252(5480): 250-251.

Magiorakos, A-P; Srinivasan, A; Carey, RB; Carmeli, Y. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18(3): 268-81.

Mamidipally, PK; Liu, SX. 2004. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106(2): 122-125.

Martínez, CD; Mercedes, S; Morales, P; Martínez, W; Martínez, M; Mayett, Y. 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. *Primera México, IMINAP, A.C.*, 42-48.

Martínez, JA; Sanchez, F. 2007. Mecanismo de acción de los antibióticos. *Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínic* 2007: 1-2.

McCue, P; Horii, A; Shetty, K. 2004. Mobilization of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Lentinus edodes* during solid-state bioprocessing is associated with enhanced production of laccase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5(3): 385-392.

Mendoza, G. 2012. Estudio de enzimas ligninolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* usando diferentes inductores. Proyecto de

Investigación previo a la obtención del Título de Master en Microbiología. Madrid- España, Universidad Autónoma de Madrid, p.44.

Miles, PG; Chang, S-T. 2004. Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2004: 480.

Ming, J; Chen, L; Hong, H; Li, J. 2015. Effect of superfine grinding on the physico-chemical, morphological and thermogravimetric properties of *Lentinus edodes* mushroom powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(12): 2431-2437.

Mizuno, T. 1995. Shiitake, *lentinus edodes* : Functional properties for medicinal and food purposes. *Food Reviews International* 11(1): 109-128.

Elección de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente (2004, Nuevo León- México). 2004. Ed. Orozco, C. Nuevo León- México, Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. 86-90 p.

Perera, C; Jasinghe, V; Mujumdar, A. 2003. The Effect of Moisture Content on the Conversion of Ergosterol to Vitamin D in Shiitake Mushrooms. *Drying Technology* 21(6): 1091-1099.

Pérez, B; Mayett, Y; Martínez, D. 2010. Propiedades nutricionales y medicinales de los hongos comestibles. *Saberes compartidos no.5*: 50-75.

Pírex, M; Mota, M. 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica: morfología y Estructura Bacteriana. Ed. D de B y Virología. 2 edición Montevideo (Uruguay), FEFMUR, 23-24.

Ponce, AG; Roura, SI; del Valle, CE; Moreira, MR. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts:

In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology* 49(2): 294-300.

Rao, JR; Millar, BC; Moore, JE. 2009. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(6): 591-592.

Regina, M; Broetto, F; Giovannozzi-Sermanni, G; Marabotini, R; Peranni, C. 2008. Influence of stationary and bioreactor cultivation on *Lentinula edodes* (berk) pegler lignocellulolytic activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51(2): 223-233.

Rivera, O; Albarracín, W; Lares, M. 2017. Componentes Bioactivos del Shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) y su impacto en la salud. *Sociedad Venezolana de Farmacología Clínica y Terapéutica* 36(798-264): 67-71.

Rodríguez, N; Jaramillo, C. 2005. Cultivo de Hongos Medicinales en la zonas agrícolas de la zona cafetera. segunda Caldas-Colombia, Cenicafe, 100-117.

Rojas, G; Le, J; Tortoriello, J; Navarro, V; Lévaro, J; Tortoriello, J; Navarro, V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 74(1): 97-101.

Romero, R. 2007. *Microbiología y parasitología humana : bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. s.l., Médica Panamericana, 1723.

Rozman, C; Farreras, P; Cardellach, F. 2012. *Medicina interna*. 17 ed. s.l., Elsevier, 11-31.

Rozzi, NL; Singh, RK. 2002. *Supercritical Fluids and the Food Industry*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1(1): 33-44.

- Ruiz, G; Susunaga, C. 2000. Actividad antimicrobiana presente en partes aereas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens* (BURSERACEAS), frente a microorganismos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinere*. 2000: 40.
- Silva, LV; Nelson, DL; Drummond, MFB; Dufossé, L; Glória, MBA. 2005. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International* 38(8-9): 1087-1096.
- Silva, R; Fritz, C; Cubillos, J; Díaz, M. 2010. Utilización de desechos de podas del arbolado urbano como sustrato para la producción de hongos comestibles (*Shiitake*) en la comuna de La Pintana. Ed. DIGA. Primera Santiago de Chile, CONAMA, 38.
- Smânia, A; Monache, F; Smânia, E; Gil, M; Benchetrit, L; Cruz, F. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology* 45(3): 177-181.
- Smith, JE; Rowan, NJ; Sullivan, R. 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters* 24(22): 1839-1845.
- Souza, N; Contessa, C; Almeida, L; Manera, A; Moraes, C. 2014. Extração e purificação de antimicrobiano do cogumelo *Pleurotus*. *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos* 2(1).
- Soxhlet, F. 1879. Soxhlet, über gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Polytechnisches Journal* 232.
- Spigno, G; De Faveri, DM. 2007. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78(3): 793-801.

- Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms = Shokuyō oyobi yakuyō kinoko no saibai. s.l., Ten Speed Press, 643.
- Stamets, P; Chilton, J. 1983. The mushroom cultivator : a practical guide to growing mushrooms at home. s.l., Agarikon Press, 415.
- Suárez, C; Nieto, I. 2012. Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (Shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. Trabajo de investigación para Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, p.122.
- Suárez, C; Nieto, IJ. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología* 30(1): 1-8.
- Suzuki, I; Hashimoto, K; Oikawa, S; Sato, K; Osawa, M; Yadomae, T. 1989. Antitumor and immunomodulating activities of a β -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 37(2): 410-413.
- Tseng, Y-H; Yen, M-T; Li, R-C; Mau, J-L. 2007. Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT - Food Science and Technology* 40(2): 255-261.
- Valencia, G; Eugenia, M; Aguilar, G; Ángel, M; Jaimes, T; Páramo, ED. 2008. Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de *Pleurotus djamor*. *Revista Mexicana de Micología* 28(1): 119-123.
- Vallat, B; Edwards, S; Bouna, A. 2004. MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DE LAS VACUNAS PARA LOS ANIMALES TERRESTRES (mamíferos, aves y abejas). 5 th edici Francia-París, OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 302-312.

- Velasco, RJ; Villada, HS; Carrera, JE. 2007. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información tecnológica* 18(1).
- Venturini, M; Rivera, C; Gonzalez, C. 2008. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Food Protect* 71: 1701-1706.
- Verma, A; Hartonen, K; Riekkola, M-L. 2008. Optimisation of supercritical fluid extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* using experimental design methodology—comparison with other extraction techniques. *Phytochemical Analysis* 19(1): 52-63.
- Villegas, V; Milena, A; Arredondo, C. 2007. Evaluación de la producción del hongo *Lentinula edodes* Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales. *Revista Colombiana de Biotecnología* 3(6): 23-39.
- Wang, HM; Xia, DZ; Xia, M; Xiang, WN; Pan, HM. 2005. Research of *Lentinan's* Effect on Blood Lipid and Its Mechanisms. *Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine* 15: 599-602.
- Wasser, S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3): 258-274.
- Wasser, S.; Weiss, AL. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. 1999.
- Watanabe, A; Yamaguchi, S; Urabe, K; Asada, Y. 2003. Occurrence of a unique amino acid racemase in a basidiomycetous mushroom, *Lentinus edodes*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23(2-6): 379-387.
- Wichtl, M. 2004. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals : a handbook for practice on a scientific basis*. s.l., Medpharm, 704.

- Willey, JM; Sherwood, L; Woolverton, CJ; Prescott, LM. 2009. Prescott, Harley, and Klein microbiología. s.l., McGraw-Hill.
- Winn, WC; Koneman, EW. 2008. Koneman diagnóstico microbiológico : texto y atlas en color. s.l., Editorial Médica Panamericana.
- Xu, C; HaiYan, Z; JianHong, Z; Jing, G. 2008. The pharmacological effect of polysaccharides from *Lentinus edodes* on the oxidative status and expression of VCAM-1mRNA of thoracic aorta endothelial cell in high-fat-diet rats. *Carbohydrate Polymers* 74(3): 445-450.
- Yamaç, M; Bilgili, F. 2006. Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharmaceutical Biology* 44(9): 660-667.
- Yen, M-TM; Mau, J-LJ. 2007. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. *Food Science and Technology* 40(3): 472-479.
- Zhang, N; Chen, H; Zhang, Y; Ma, L; Xu, X. 2013. Comparative studies on chemical parameters and antioxidant properties of stipes and caps of shiitake mushroom as affected by different drying methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(12): 3107-3113.
- Zhang, Y; Geng, W; Shen, Y; Wang, Y; Dai, YC. 2014. Edible mushroom cultivation for food security and rural development in China: Bio-innovation, technological dissemination and marketing. *Sustainability (Switzerland)* 6(5): 2961-2973.
- Zhu, X; Jiangxi; Zhongyiyao. 1985. Tratamiento de la hepatitis viral crónica B y HBsAg portadores con polisacáridos de *Lentinus edodes*. *ELSEVIER* 5: 20-25.

ANEXOS

ANEXO 1. Mapa de ubicación del experimento

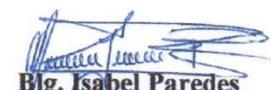


ANEXO 2. Resultados de análisis físico-químicos.



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN
LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA



RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE HUMEDAD			
FECHA/HORA DE INGRESO AL LABORATORIO	22/11/2017 - 09H00		
SOLICITANTE	JORDANI EDUARDO SANABRIA		
TIPO DE MUESTRA	HARINA DEL HONGO SHIITAKE		
FECHA DE SALIDA DE ANÁLISIS	24/11/2017		
MUESTRAS	MÉTODO DE ANÁLISIS	UNIDAD	RESULTADOS
Estipe del Shiitake	AOAC 925.10	PORCENTAJE (%)	11
	AOAC 925.10	PORCENTAJE (%)	12
	AOAC 925.10	PORCENTAJE (%)	10
Píleo del Shiitake	AOAC 925.10	PORCENTAJE (%)	11
	AOAC 925.10	PORCENTAJE (%)	8.9
	AOAC 925.10	PORCENTAJE (%)	10.6
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  Ing. Marcelo Vilcacundo DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  Blg. Isabel Paredes TÉCNICA-DOCENTE </div> </div>			



RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE CENIZAS

FECHA/HORA DE INGRESO AL LABORATORIO 22/11/2017 - 09H00
SOLICITANTE JORDANI EDUARDO SANABRIA
TIPO DE MUESTRA HARINA DEL HONGO SHIITAKE
FECHA DE SALIDA DE ANÁLISIS 24/11/2017

MUESTRAS	MÉTODO DE ANÁLISI	UNIDAD	RESULTADOS
Estipe del Shiitake	AOAC 923.03	PORCENTAJE (%)	7.5
	AOAC 923.03	PORCENTAJE (%)	7.2
	AOAC 923.03	PORCENTAJE (%)	9.0
Píleo del Shiitake	AOAC 923.03	PORCENTAJE (%)	2.8
	AOAC923.03	PORCENTAJE (%)	3.7
	AOAC 923.03	PORCENTAJE (%)	3.4


Ing. Marcelo Vilcacundo
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN



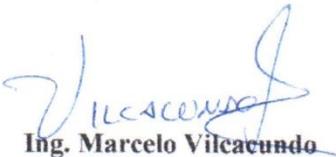

Blg. Isabel Paredes
TÉCNICA-DOCENTE



RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE FIBRA

FECHA/HORA DE INGRESO AL LABORATORIO	11/12/2017 - 10H00
SOLICITANTE	JORDANI EDUARDO SANABRIA
TIPO DE MUESTRA	HARINA DEL HONGO SHIITAKE
FECHA DE SALIDA DE ANÁLISIS	14/11/2017

MUESTRAS	MÉTODO DE ANÁLISIS	UNIDAD	RESULTADOS
Estipe del Shiitake	NTE INEN 522:2012	PORCENTAJE (%)	22.3
	NTE INEN 522:2012	PORCENTAJE (%)	21.7
	NTE INEN 522:2012	PORCENTAJE (%)	24.5
Pileo del Shiitake	NTE INEN 522:2012	PORCENTAJE (%)	6.5
	NTE INEN 522:2012	PORCENTAJE (%)	7.0
	NTE INEN 522:2012	PORCENTAJE (%)	6.7


Ing. Marcelo Vilcacundo
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE
INVESTIGACIÓN



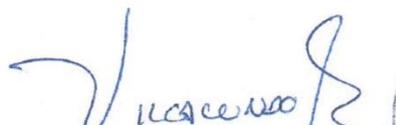

Blg. Isabel Paredes
TÉCNICA-DOCENTE



RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE GRASA

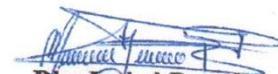
FECHA/HORA DE INGRESO AL LABORATORIO 11/12/2017 - 10H00
SOLICITANTE JORDANI EDUARDO SANABRIA
TIPO DE MUESTRA HARINA DEL HONGO SHIITAKE
FECHA DE SALIDA DE ANÁLISIS 14/11/2017

MUESTRAS	MÉTODO DE ANÁLISIS	UNIDAD	RESULTADOS
Estipe del Shiitake	NTE INEN-ISO11085	PORCENTAJE (%)	1.35
	NTE INEN-ISO11085	PORCENTAJE (%)	1.25
	NTE INEN-ISO11085	PORCENTAJE (%)	1.55
Pileo del Shiitake	NTE INEN-ISO11085	PORCENTAJE (%)	2.5
	NTE INEN-ISO11085	PORCENTAJE (%)	2.1
	NTE INEN-ISO11085	PORCENTAJE (%)	2.3


Ing. Marcelo Vilcacundo

DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN




Big. Isabel Paredes

TÉCNICA-DOCENTE



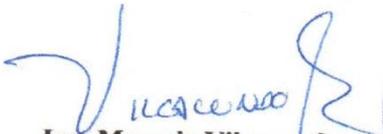
UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN
LABORATORIO DE SUELOS Y AGUAS



RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PROTEÍNA

FECHA/HORA DE INGRESO AL LABORATORIO 11/12/2017 - 09H30
SOLICITANTE JORDANI EDUARDO SANABRIA
TIPO DE MUESTRA HARINA DEL HONGO SHIITAKE
FECHA DE SALIDA DE ANÁLISIS 13/12/2017

ID DE LAS MUESTRAS	MÉTODO DE ANÁLISIS	% DE NITRÓGENO	FACTOR DE CONVERSIÓN	PROTEÍNA (g/100 g)
HLEE1	AOAC 990.03	4.21	4.38	18.44
HLEE2	AOAC 990.03	4.76	4.38	20.85
HLEE3	AOAC 990.03	4.49	4.38	19.67
HLEP1	AOAC 990.03	5.62	4.38	24.62
HLEP2	AOAC 990.03	5.58	4.38	24.44
HLEP3	AOAC 990.03	5.39	4.38	23.61


Ing. Marcelo Vilcacundo
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN




Blg. Isabel Paredes
TÉCNICA-DOCENTE

ANEXO 3. Base de datos

Valores del volumen de los extractos

Tratamientos	Código	R1	R 2	R3	Promedio	Desviación (σ)
1	a ₁ b ₁	68	70	64	67.3	2.49
2	a ₁ b ₂	60	62	64	62	1.63
3	a ₁ b ₃	68	61	64	64.3	2.87
4	a ₁ b ₄	59	62	60	60.3	1.25
5	a ₂ b ₁	65	59	63	62.3	2.49
6	a ₂ b ₂	59	56	57	57.3	1.25
7	a ₂ b ₃	62	60	58	60	1.63
8	a ₂ b ₄	56	50	52	52.7	2.49

Medición de los halos de inhibición de la *Listeria spp*

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	P	C
Rep. 1	6	14	4	9	5	10	4	8	15	1
Rep. 2	4	12	4	9	4	10	3	8	14	1
Rep. 3	6	12	4	8	5	10	4	8	17	1
Promedio	5.3	12.7	4	8.7	4.7	10	3.7	8	15.3	1
σ	0.94	0.94	0	0.47	0.47	0	0.47	0	1.25	0

Medición de los halos de inhibición de la *Salmonella spp*

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	P	C
Rep. 1	6	10	4	6	6	8	3	6	1	24
Rep. 2	4	9	4	7	6	8	4	6	2	23
Rep. 3	8	9	5	8	4	7	3	6	1	25
Promedio	6	9.3	4.3	7.0	5.3	7.7	3.3	6	1.3	24.0
σ	1.63	0.47	0.47	0.94	0.94	0.47	0.47	0	0.47	0.82

Medición de los halos de inhibición de la *E. coli*

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	P	C
Rep. 1	3	8	4	7	3	8	4	6	0	23
Rep. 2	3	8	4	7	2	6	4	7	0	26
Rep. 3	4	8	5	7	3	6	4	6	1	26
Promedio	3.3	8	4.3	7	2.7	6.7	4	6.3	0.3	25
σ	0.47	0	0.47	0	0.47	0.94	0	0.47	0.47	1.41

ANEXO 4. Fotografías de la investigación

Siembra del *Lentinula edodes* sobre sustratos lignocelulósicos

Preparación y esterilización de los sustratos



Inoculación del hongo en los sustratos



Incubación en fundas oscuras y colonización del sustrato



Oscurecimiento del sustrato y aparición de primordios



Cosecha y medición y pesado del micelio del hongo



Preparación de los extractos

Secado y selección de las partes del hongo *Lentinula edodes*



Pulverizado y pesado de las muestras de hongo

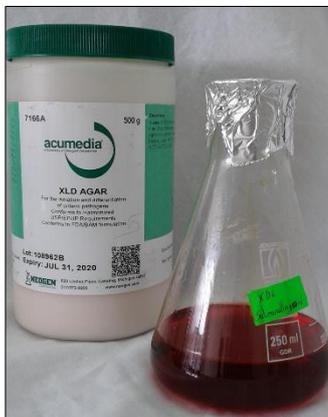


Centrifugado, filtrado y envasado del extracto

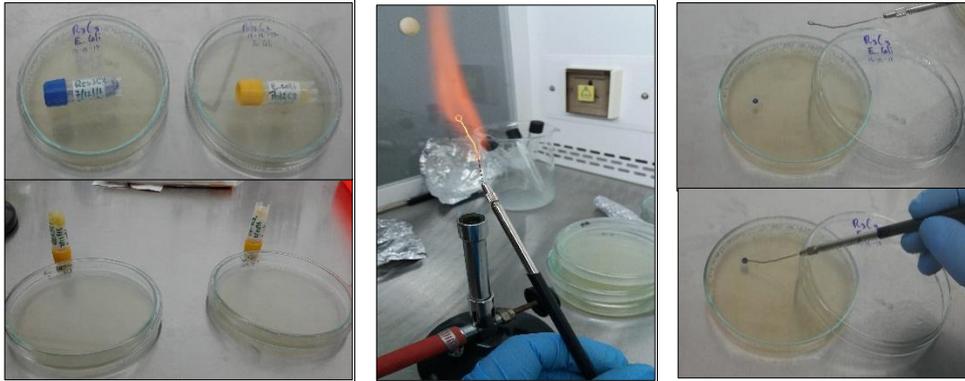


Preparación de Agares

Agar XLD para *Salmonella* Agar nutriente para *E. coli* Agar Cromogenic *Listeria*

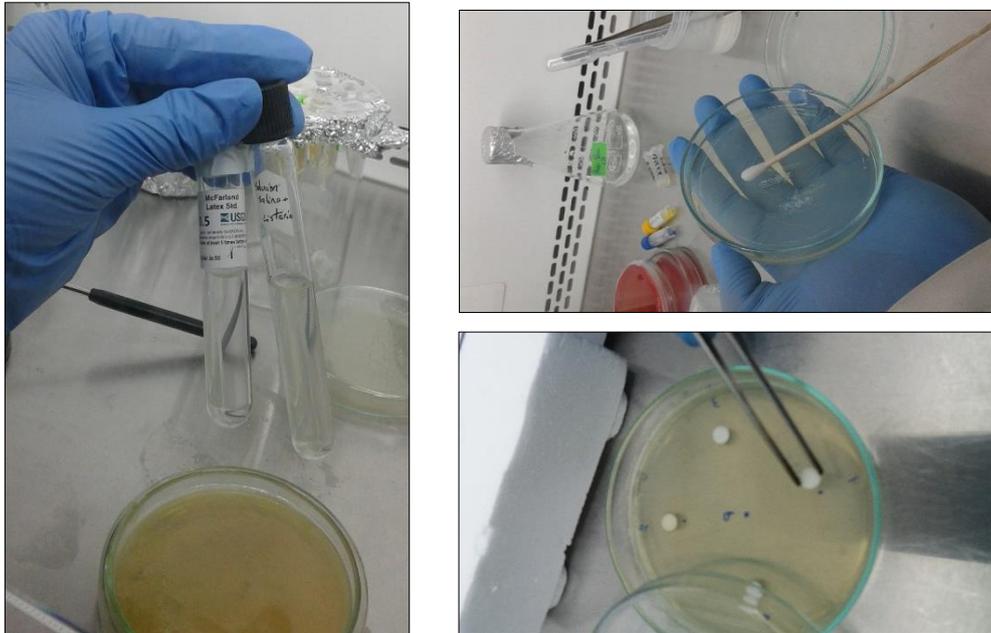


Inoculación de las bacterias patógenas para activarlas



Antibiograma de disco (técnica de Kirby-Bauer)

Siembra de los microorganismos patógenos en Agar Müller-Hinton

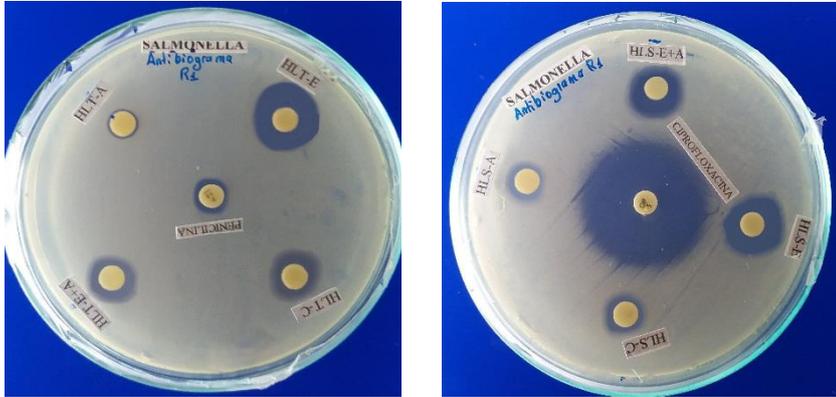


Rotulación de las cajas de Petri e incubación

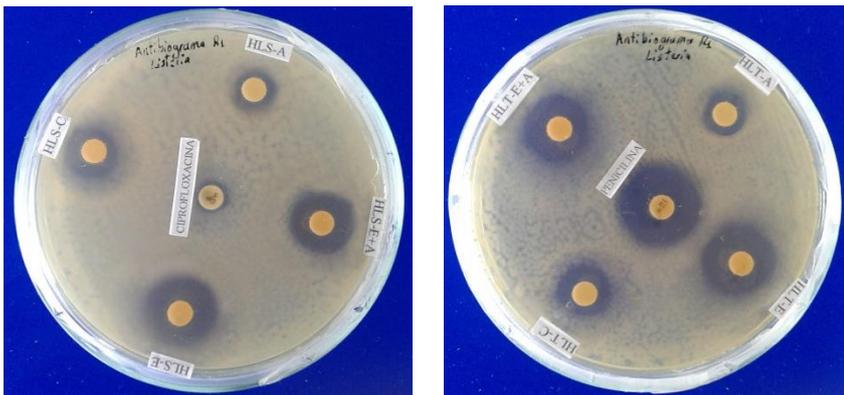


Medición de los halos de inhibición

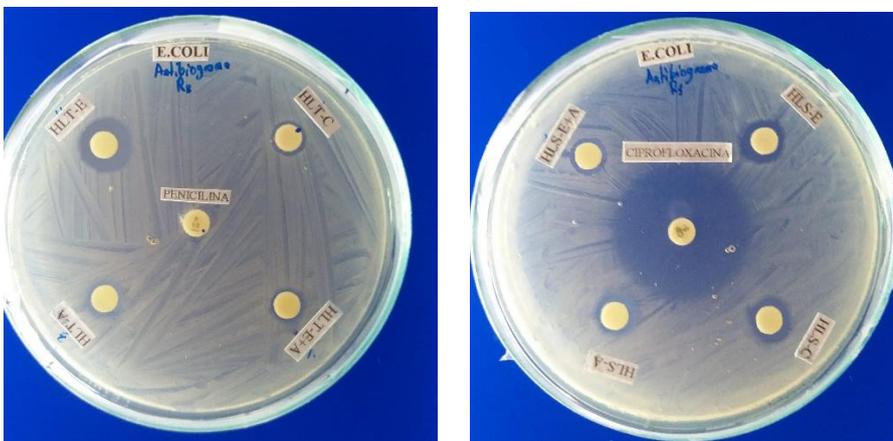
Halos de inhibición de la bacteria *Salmonella spp* frente a los extractos del píleo y estipe del hongo *Lentinula edodes*



Halos de inhibición de la bacteria *Listeria spp* frente a los extractos del píleo y estipe del hongo *Lentinula edodes*



Halos de inhibición de la bacteria *Escherichia coli* frente a los extractos del píleo y estipe del hongo *Lentinula edodes*



ANEXO 5. Glosario de términos técnicos

Extracto: Un extracto es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo.

Extracto acuoso: Preparación en agua de la sustancia de una planta o un animal que contiene la porción biológicamente activa sin el residuo celular.

Extracto etílico: Es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer.

Metabolitos secundarios: Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente.

Antibiograma: son métodos in Vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específica y estandarizada.

Concentración Mínima Inhibitoria (CIM): Es la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible.

Antibióticos: Son sustancias químicas producidas por organismos vivientes, o sintetizados en el laboratorio capaces de inhibir en pequeñas cantidades los procesos vitales de microorganismos, destruyendo e impidiendo su desarrollo y reproducción